

Письмо редакторов

Дорогие читатели!
Традиционно новый номер журнала открывается обзорными публикациями. Первая работа исходит из известнейшей новосибирской школы биооргаников (Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН) и посвящена эскорт-аптамерам. В обзоре рассмотрены инновационные методы адресной доставки лекарств с использованием олиго-рибо- и дезоксирибонуклеотидов, узнающих различные клеточные мишени. Следующая обзорная статья также относится к современным «горячим точкам роста», а именно мезенхимальным стволовым клеткам. Она представлена всемирно известным авторским коллективом факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова. В работе затронуты как фундаментальные аспекты проблемы, так и возможности стволовых клеток для репарации и регенерации тканей. Классический обзор в области биотехнологии и биоинженерии формиадегидрогеназ представлен коллективом из МГУ им. М.В. Ломоносова и Института биохимии им. А.Н. Баха РАН.

Экспериментальные работы открываются статьей коллектива авторов из МГУ им. М.В. Ломоносова, ИМБ РАН им. В.А. Энгельгардта и Исследовательского центра из Гамбурга и посвящена разработке перспективных клеточных моделей для скрининга анти-ВИЧ-1-препаратов. Проблеме использования стволовых клеток для регенерации сетчатки глаза посвящена работа сотрудников Института общей патологии и патофизиологии РАМН и МГУ им. М.В. Ломоносова. Сегодня весьма актуальной является проблема экспрессии белков в растениях. Эта проблема нашла отражение в работе сотрудников Института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова и биологического

факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. В работе весьма четко обозначены практические перспективы направления по экспрессии эпитопов вакцинных белков. Весьма актуальные исследования в области врожденного иммунитета представлены сотрудниками Института эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи. Необходимо подчеркнуть, что Нобелевская премия по физиологии и медицине 2011 года присуждена именно за развитие концепции врожденного иммунитета. Работа практической направленности по созданию ингибиторов-антибиотиков, направленных на подавление активности ДНК-гираз, представлена Институтами РАН – ИМБ им. В.А. Энгельгардта и Института органического синтеза им. И.Я. Попова. Исследование в области клеточной биологии, а именно изменения ядрышка в митозе, представлено сотрудниками ИБХ РАН им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова. Антибактериальная активность фотосенсибилизирующих агентов стала предметом разработки, обобщенной в статье сотрудников Медуниверситета им. Н.И. Пирогова (Москва) и Института эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи. Цикл экспериментальных статей завершается публикацией приоритетной работы исследователей ИБХ РАН им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, открывших новый путь регуляции кислотно-щелочного баланса у животных.

Как всегда мы не могли обойти животрепещущие вопросы развития отечественной науки. В разделе «Форум» представлен аналитический обзор деятельности программы «Живые системы» Минобрнауки.

Редакционная коллегия и редакционный совет журнала «Acta Naturae» желают своим читателям успехов в исследовательской деятельности и приглашают к сотрудничеству. ●

Наука и технологии России – STRF.ru



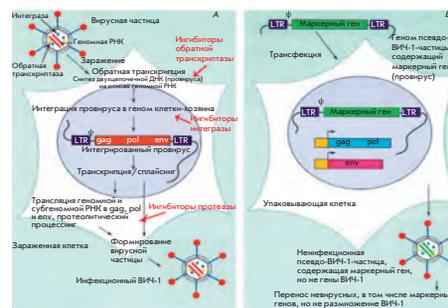
- 40% учёных согласны с тем, что публикации о результатах научной работы способствуют просвещению общества, росту престижа профессии учёного, улучшению имиджа науки
- 34% считают, что, распространяя информацию о результатах своей работы, они смогут привлечь клиентов, партнёров, деньги
- 12% надеются, 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

Скрининг потенциальных ингибиторов/блокаторов репликации ВИЧ-1 с помощью безопасной лентивирусной системы *in vitro*

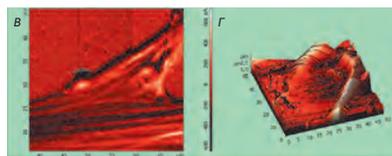
М. М. Прокофьева, П. В. Спирин, Д. В. Январев, А. В. Иванов, М. С. Новиков, О. А. Степанов, М. Б. Готтих, С. Н. Кочетков, В. Fehse, С. Stocking, В. С. Прасолов

Разработка безопасных клеточных систем для тестирования соединений, обладающих анти-ВИЧ-активностью, важна для создания новых противовирусных препаратов. Детально охарактеризована разработанная на основе лентивирусных векторов система для быстрого и полностью безопасного скрининга потенциальных ингибиторов репликации ВИЧ-1. Система позволяет проводить испытания ингибиторной активности соединений, действие которых направлено как на обратную транскриптазу и интегразу ВИЧ-1 дикого типа, так и на мутантные ферменты, соответствующие лекарственно-устойчивым формам вируса. Применение этой системы существенно расширяет возможности доклинических испытаний анти-ВИЧ-препаратов.



Жизненный цикл инфекционного ВИЧ-1 (А) и получение рекомбинантных псевдо-ВИЧ-1-частиц в упаковывающих клетках (Б).

Поведение мультипотентных клеток, трансплантированных *in vitro* в поврежденную сетчатку глаза



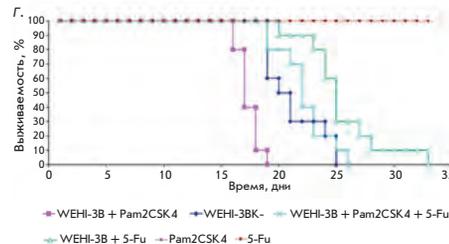
Образование синаптических контактов между трансплантированными ММСК и клетками сетчатки.

С. А. Сергеев, Ю. В. Храмова, М. Л. Семенова, И. Н. Сабурин, Н. В. Кошелева
Применение клеточных технологий позволило добиться существенного прогресса в лечении дефектов сетчатой оболочки глаза. Однако вопросы функционального замещения утраченных нейронов сетчатки трансплантированными клетками остаются открытыми. Для доказательства возможности трансдифференцировки трансплантированных EGFP⁺-клеток стромы костного мозга (ММСК) и нейрональных стволовых/прогениторных клеток (НСПК) мышей с последующей их функциональной интеграцией применен метод органотипического культивирования, позволяющий детально охарактеризовать поведение клеток после трансплантации.

Активация TLR2-зависимого сигнального пути в клетках WEHI-3В миеломоноцитарного лейкоза мышей приводит к подавлению развития в них апоптоза и к стимуляции прогрессии опухоли в условиях *in vivo*

Д. В. Щербляков, Д. Ю. Логунов, И. В. Раковская, М. М. Шмаров, Б. С. Народицкий, А. Л. Гинцбург

Толл-подобные рецепторы (TLR) являются главными компонентами системы врожденного иммунитета, которые выполняют важные функции в формировании реакций иммунной защиты организма против развивающейся бактериальной или вирусной инфекции. Благодаря своей способности усиливать специфические и неспецифические иммунные реакции агонисты Толл-подобных рецепторов нашли применение не только в терапии инфекционных заболеваний, но и в химиотерапии различных злокачественных новообразований. Однако различные агонисты TLR могут обладать как противоопухолевым действием (липолисахарид, имиквимод, CpG), так и, напротив, в определенных условиях повышать устойчивость опухолевых клеток к апоптозу и стимулировать их пролиферацию (липолисахарид, липопептид). Нами показано, что активация TLR2-зависимого сигнального пути в клетках миеломоноцитарного лейкоза мышей WEHI-3В при добавлении агониста TLR2 – синтетического липопептида Pam2CSK4, или инфицировании опухолевых клеток *Mycoplasma arginini* приводит к конститутивной активации в них фактора транскрипции NF- κ B, подавлению развития апоптоза, а также к усилению прогрессии миеломоноцитарного лейкоза в условиях *in vivo*.



Влияние диациллипептида Pam2CSK4 на пролиферацию опухолевых клеток WEHI-3В и их резистентность к химиотерапевтическим средствам. Диаграмма выживаемости мышей линии BALB/c.

Acta Naturae

ТОМ 3, № 4 (11), ОКТЯБРЬ—ДЕКАБРЬ 2011

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. Швядас (Москва, Россия),
Н.К. Янковский (Москва, Россия)

Руководитель проекта: Е.А. Новосёлова

Выпускающий редактор: Н.Ю. Деева

Директор по стратегическому развитию:

Е.Л. Пустовалова

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

Верстка: К.К. Опарин

Корректур: Р.С. Шаймарданова

Дизайн-проект: Х. Шнайдер

Адрес редакции: 119991, Москва, Ленинские горы,

Научный парк МГУ, владение 1, строение 75Г.

Телефон/факс: +7 (495) 930 80 05.

E-mail: actanaturae@gmail.com, enovoselova@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, 2011

Номер подписан в печать 11 октября 2011 г.

Тираж 300 экз. Цена свободная.

Отпечатано в типографии «МЕДИА-ГРАНД»

Журнал «Acta Naturae» входит в Перечень ведущих периодических изданий Высшей аттестационной комиссии Минобрнауки России

СОДЕРЖАНИЕ

Письмо редакторов. 1

ФОРУМ

Е. В. Поверенная, А. В. Лисица, А. Н. Петров,
А. А. Макаров, Н. Г. Лузгина

Статистический анализ итогов конкурсов на выполнение научно-исследовательских работ по приоритетному направлению «Живые системы» 6

ОБЗОРЫ

А. С. Давыдова, М. А. Воробьева,
А. Г. Веняминова

Эскорт-аптамеры: новые инструменты для направленной доставки лекарственных препаратов в клетки 13

Н. И. Калинина, В. Ю. Сысоева, К. А. Рубина,
Е. В. Парфенова, В. А. Ткачук

Мезенхимальные стволовые клетки в процессах роста и репарации тканей 32

А. А. Алексеева, С. С. Савин, В. И. Тишков

NAD⁺-зависимая формаатдегидрогеназа растений 40

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

М. М. Прокофьева, П. В. Спиринов, Д. В. Январев,
А. В. Иванов, М. С. Новиков, О. А. Степанов,
М. Б. Готтих, С. Н. Кочетков, В. Fehse,
С. Stocking, В. С. Прасолов

Скрининг потенциальных ингибиторов/блокаторов репликации ВИЧ-1 с помощью безопасной лентивирусной системы *in vitro* 57

С. А. Сергеев, Ю. В. Храмова, М. Л. Семенова,
И. Н. Сабурова, Н. В. Кошелева

Поведение мультипотентных клеток, трансплантированных *in vitro* в поврежденную сетчатку глаза. 68

Л. Г. Тюлькина, Е. В. Скурат, О. Ю. Фролова,
Т. В. Комарова, Е. М. Каргер, И. Г. Атабеков

Новый вирусный вектор для суперпродукции эпитопов вакцинных белков в растениях 76

Д. В. Щепляков, Д. Ю. Логунов, И. В. Раковская,
М. М. Шмаров, Б. С. Народицкий, А. Л. Гинцбург

Активация TLR2-зависимого сигнального пути в клетках WEHI-3В миеломоноцитарного лейкоза мышей приводит к подавлению развития в них апоптоза и к стимуляции прогрессии опухоли в условиях *in vivo* 87

В. Л. Туницкая, А. Р. Хомутов, С. Н. Кочетков,
С. К. Котовская, В. Н. Чарушин

Ингибирование ДНК-гиразы левофлоксацином и другими производными фторгетероциклов 98

К. В. Шишова, О. О. Жарская, О. В. Зацепина

Судьба ядрышка в митозе: сравнительный анализ локализации некоторых форм пре-рРНК методом флуоресцентной гибридизации *in situ* в фибробластах мыши NIH/3T3 105

Т. А. Шмиголь, В. А. Бехало, Е. В. Сысолятина,
Е. В. Нагурская, С. А. Ермолаева,
А. Я. Потапенко

Влияние хлорида натрия на агрегацию мероцианина 540 и фотосенсибилизированную инактивацию *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* . . . 112

И. Е. Деев, Д. И. Ржевский, А. А. Берчатова,
О. В. Серова, Н. В. Попова, А. Н. Мурашев,
А. Г. Петренко

Декомпенсированный метаболический алкалоз у мышей с нокаутом гена *insrr* 119

Правила для авторов 123

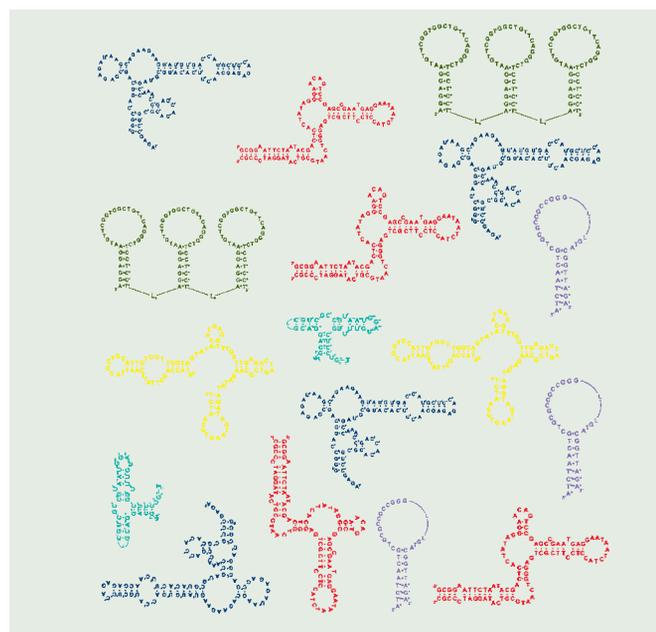


РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ

Предполагаемые вторичные структуры аптамеров.
(См. обзор Давыдовой и др.)

Статистический анализ итогов конкурсов на выполнение научно-исследовательских работ по приоритетному направлению «Живые системы»

Е. В. Поверенная^{1*}, А. В. Лисица¹, А. Н. Петров², А. А. Макаров³, Н. Г. Лузгина⁴

¹Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАН, Москва

²Дирекция ЦНТП Минобрнауки России, Москва

³Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва

⁴Научный центр клинической и экспериментальной медицины СО РАН, Новосибирск

*E-mail: k.poverennaya@gmail.com

Процедура оценки и сопоставления заявок, поступающих на открытые конкурсы на выполнение научно-исследовательских работ для государственных и муниципальных нужд, осуществляется в соответствии с нормами 94-ФЗ. Соотношения значений различных критериев оценки заявок (цена, сроки, качество работ) установлены законодательно и позволяют в результате вычислений по универсальной формуле присвоить каждой заявке индивидуальный рейтинг, по которому и выбираются победители конкурса. Авторы данной статьи охарактеризовали взаимосвязь между ценой и качеством НИР, предлагаемых участниками размещения заказа, и оценили эффективность применения законодательно установленных весовых значений различных критериев оценки заявок.

В законе 94-ФЗ [1] заложены представления о том, что для государственного заказчика исключительно важны более низкая стоимость и (или) сокращение сроков выполнения работы (поставки товаров, оказания услуг), что отражено в рекомендованном порядке оценки и сопоставления конкурсных заявок. Другими словами, низкая цена и малые сроки более существенны, чем качество выполнения работ. Превалирование стоимости работ над их качеством потенциально снижает значимость результатов

экспертизы НИР при принятии государственным заказчиком решения о выборе исполнителей.

В период с декабря 2010 по январь 2011 года в рамках мероприятия 1.2 («Проведение проблемно-ориентированных поисковых исследований и создание научно-технического задела по технологиям в области живых систем») ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы» [2] объявлено четыре очереди конкурсов,

допускавших заключение контрактов по каждому лоту с несколькими участниками размещения заказа («зонтичные» лоты). При размещении заказа предлагалось участвовать в выполнении поисковых и прикладных НИР с максимальной ценой контракта 6 и 12 млн рублей соответственно. На состоявшемся в Москве круглом столе «Новые подходы к регулированию госзакупок в науке» было отмечено, что по итогам размещения заказа демпинг по научным конкурсам дошел до 60% [3].

Впервые для развития научно-технологического потенциала страны конкурс проводился в условиях, когда для соблюдения требований Постановления Правительства РФ от 10 сентября 2009 года № 722 [4] было установлено, что удельный вес ценового предложения в общей оценке заявки составляет более половины (55%). Важно отметить, что все четыре очереди объявили за довольно короткий промежуток времени, т.е. у участников размещения заказа была ограничена возможность изменить тактику участия в конкурсе.

Нами проанализированы следующие данные, представленные в протоколах оценки и сопоставления заявок на участие в конкурсе

по мероприятию 1.2 ФЦП, очереди 3–6 [5]:

- максимальная цена лота;
- наименование участника размещения заказа;
- экспертная оценка заявок по критерию «техническая характеристика создаваемой научно-технической продукции» (максимально 35 баллов);
- экспертная оценка по критерию «профессиональная репутация участника конкурса» (максимально 40 баллов);
- экспертная оценка по критерию «опыт выполнения работ» (максимально 25 баллов);
- цена работ, предложенная участником размещения заказа.

Всего был проанализирован 41 лот. В конкурсе по этим лотам приняли участие 183 организации, и каждая организация подала минимум одну заявку. Всего на конкурс была подана (и включена в анализ) 421 заявка. Приведенные в протоколах данные были представлены в виде электронной таблицы. В рассматриваемых очередях лоты на выполнение поисковых и прикладных НИР отличались по начальной цене, поэтому предложенную участником размещения заказа цену нормировали на максимальную цену лота и полученное значение *снижения цены* выражали в процентах. Данные обрабатывали с использованием автоматизированных функций пакета Microsoft Excel, включая сортировку, расчет значений по заданной формуле, расчет среднего и доверительного интервала, расчет коэффициента корреляции, построение гистограмм и линейной аппроксимации.

В связи с тем, что экспертные оценки по критериям «техническая характеристика создаваемой научно-технической продукции», «профессиональная репутация участника конкурса и квалификация коллектива исполнителей» и «опыт выполнения работ» кор-

ректировали (коэффициент корреляции выше 0.73) друг с другом, в качестве интегральной оценки брали сумму перечисленных выше критериев, которую далее обозначали как *оценку научной составляющей*.

Для расчета статистической поправки анализировали зависимость между оценкой научной составляющей V (*value*) и снижением цены C (*cost*). Чтобы выявить эту зависимость отбирали заявки, поступившие от 49 (из 183 организаций-участников) наиболее активных участников размещения заказа, т.е. подавших не менее трех заявок по разным конкурсным лотам, причем как минимум одна заявка из поданных была признана победителем.

По трем и более заявкам, поступившим от одного участника, усредняли оценку научной составляющей и снижение цены, и в соответствии с полученными средними значениями V и C наносили точку на график. В случае, если одному значению снижения цены соответствовало несколько точек (от разных участников), то перед усреднением исключали выбросы по формуле Стьюдента ($p \geq 0.95$). Полученный точечный график аппроксимировали линейной зависимостью вида $V = aC + b$, где значения констант a и b получали методом наименьших квадратов (встроенные средства пакета Microsoft Excel).

Значение константы a , определяющей угол наклона аппроксимирующего линейного уравнения, использовали в качестве статистической поправки исходя из выражения (1):

$$a = \frac{dV}{dC} = \frac{V - V'}{C' - C}, \quad (1)$$

где значения V и C брали из усредненных сведений, представленных в официальных протоколах, а V' и C' обозначали значения, скор-

ректированные согласно условию, что снижение стоимости работ не должно приводить к ухудшению качества выполнения работ. Полагая, что минимальное значение снижения цены, не приводящее к ухудшению качества, составляет $C' = 0$, для расчета *скорректированной оценки научной составляющей* V' выражение (1) преобразовали:

$$V' = V - |a|C. \quad (2)$$

(Модуль указан, поскольку коэффициент a имеет отрицательное значение в силу обратно пропорциональной зависимости между оценкой научной составляющей и снижением цены.)

С использованием формулы (2) был произведен ретроспективный расчет скорректированных значений оценок научной значимости 421 заявки, поступившей на конкурсные лоты четырех очередей. По каждому конкурсному лоту итоговую балльную оценку заявок рассчитывали по формуле, приведенной в конкурсной документации:

$$R = 0.45V' + 0.55C. \quad (3)$$

Заявки были отсортированы (ранжированы) по степени убывания итоговой балльной оценки.

Для сопоставления рейтингов заявок в качестве исходного экспертного рейтинга брали порядок следования заявок после сортировки по итоговой балльной оценке, полученной с учетом статистической поправки по формуле (3). С исходным рейтингом сравнивали модельные рейтинги, полученные при значениях удельного веса критерия «качество», варьирующего в диапазоне от 0.45 до 1.00 с шагом 0.05. В соответствии с изменением веса критерия «качество» изменяли удельный вес критерия «цена», чтобы сумма критериев была равна единице.

Для сопоставления модельных и экспертных рейтингов использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена (КРК):

$$r_s = 1 - \frac{6 \sum d^2}{n(n^2 - 1)}, \quad (4)$$

где d – разность между рангами по каждой заявке в лоте, а n – количество заявок в лоте. КРК рассчитывали для каждого лота отдельно, при этом из анализа исключили пять лотов, содержащих менее пяти заявок, для остальных 36 лотов оценивали достоверность КРК с использованием критического значения r_s при заданном количестве заявок на лот. Отбирали значения ранговой корреляции, достоверные при уровне значимости $p \geq 0.95$, и отобранные значения усредняли по всем лотам. Средние значения наносили на график в соответствии с удельными весами критерия «качество работ», для которых моделировали рейтинги. На графике методом наименьших квадратов находили два аппроксимирующих уравнения, соответствующих линейным участкам зависимости КРК от удельного веса. Уравнения решали в системе для определения значения удельного веса критерия «качество работ», при превышении которого КРК существенно не возрастает при увеличении удельного веса.

Приведенные в протоколах оценки и сопоставления заявок данные отображены на рис. 1 в виде гистограммы, показывающей количество поступивших заявок для диапазонов снижения цены. Менее 5% заявок (21 предложение из 421 заявки) поступило без снижения цены, т.е. стоимость работ соответствовала начальной (максимальной) цене государственного контракта. Более чем у 95 заявок (22.6%) снижение цены превысило 50%. Средний показатель снижения цены составил 30% для всех проанализированных заявок.



Рис. 1. Распределение заявок на выполнение НИР в зависимости от степени снижения цены по отношению к максимальной цене конкурсного лота. Стрелками отмечены пиковые значения.

Как видно из гистограммы (рис. 1), распределение заявок имеет три четко выраженных пика, соответствующих снижению цены на 15, 30 и 50%. Наличие пиков позволяет обсудить общие предпосылки, лежащие в основе принятия участником решения о стоимости своей работы. Можно допустить, что снижение цены до 15%, наблюдавшееся в 155 заявках, некритично для научной части работы и может быть достигнуто административным решением об уменьшении накладных расходов (покрытие накладных расходов из собственных средств участника размещения заказа). Снижение ценового предложения на 30% может указывать на возможность методического и ресурсного задела у заявителя, например запаса расходных материалов или реагентов, достаточных для обеспечения НИР. В диапазон снижения цены от 15 до 30% включительно вошло 119 заявок (т.е. 28% от общего числа). Следующая категория включает 96 заявок, в которых снижение цены составляло от 30 до 50%. В данном случае следует предположить, что снижение цены будет сказываться на качестве предложения о выполнении работ. Наконец,

на гистограмме видна группа из 51 заявки, где цена снижена более чем на 50%. Таких заявок вдвое меньше, чем в каждой из предыдущих категорий. Это означает, что тактика снижения цены в два и более раз выпадает из общих представлений, которых придерживаются участники размещения заказа при оценке стоимости научной работы.

Анализ сведений, опубликованных в составе протоколов конкурсной комиссии, позволяет получить представления об активности и эффективности участников размещения заказа. Наибольшее число заявок поступило от участников с низкой активностью, которые подавали в большинстве случаев одну, в ряде случаев – две заявки. Как видно из гистограммы на рис. 2, таких участников было 132, т.е. значительно больше половины. Данных по одной-двум заявкам недостаточно для статистического анализа. Кроме того, как видно на рис. 2, участники, проявившие низкую активность участия в конкурсах, редко признаются победителями. Возможно, единичные заявки поступают от учреждений, профиль деятельности которых не вполне отвечает приоритетам критических тех-

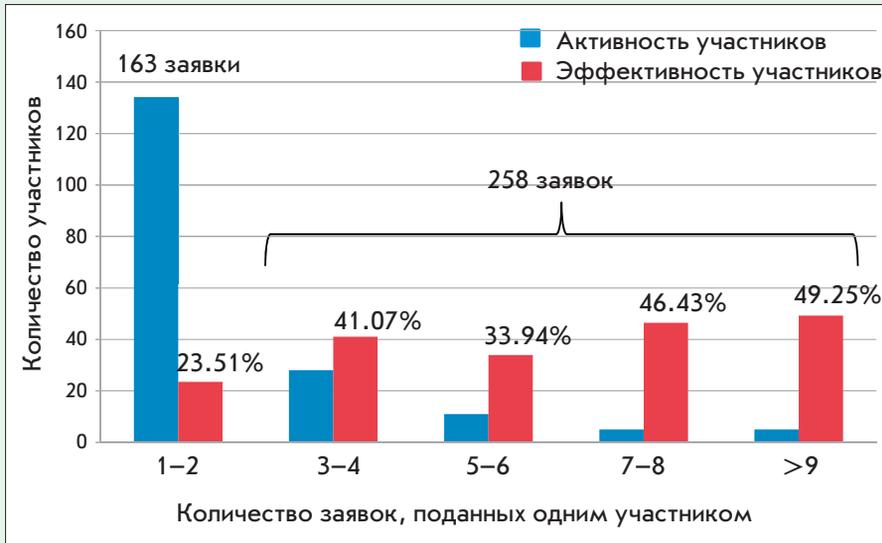


Рис. 2. Распределение значений активности и эффективности участников размещения заказа по «зонтичным» лотам. Активность – число заявок, поданных участником размещения заказа за анализируемый период времени, эффективность – отношение числа «победивших» заявок к общему числу поданных участником заявок.

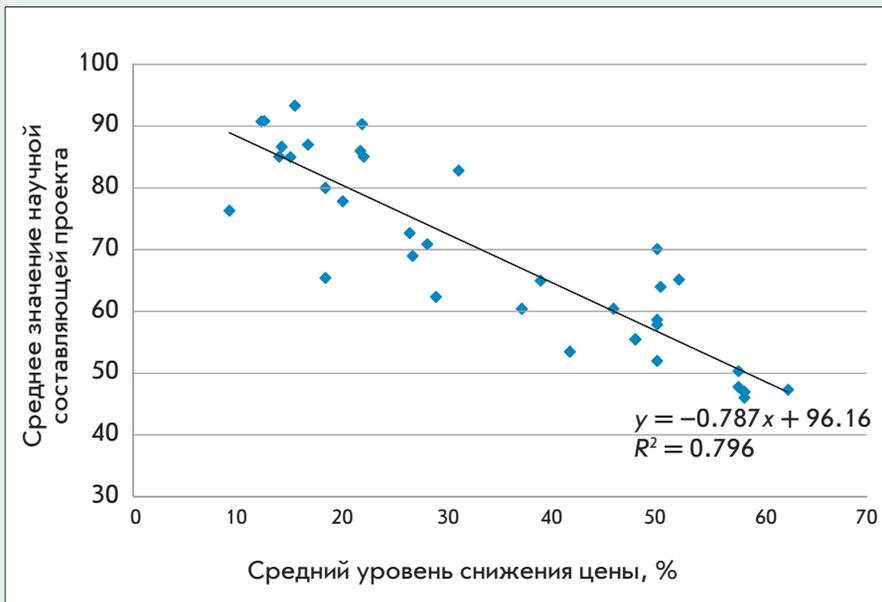


Рис. 3. Линейная аппроксимация зависимости между экспертной оценкой качества (V) и снижением цены заявки (С). Каждая точка соответствует одному участнику конкурса, соответствующие значения снижения цены и качества усреднены по победившим заявкам.

нологий либо связан с узконаправленной научной деятельностью. Замкнутость на узком круге специфических задач снижает конкурентоспособность единичных

заявок, что отражается на низкой эффективности участников, подавших по одной заявке – 23.5%.

Для участников размещения заказа, подавших три и более за-

явки, характерна высокая эффективность (рис. 2). У участников, которые подали три-четыре заявки, эффективность превысила 40%, т.е. практически половина заявок выигрывала конкурс. Можно сделать вывод, что работа учреждения по нескольким тематикам повышает конкурентоспособность и, скорее всего, именно такие участники размещения заказа в наибольшей степени оказывают влияние на развитие приоритетного направления «Живые системы» («Науки о жизни») в стране. Исходя из приведенных соображений, в дальнейшем анализировали данные о качестве заявок активных участников заказа, подавших три и более заявки. Всего таких участников оказалось 49.

Прежде чем перейти к анализу качества заявок, следует отметить взаимосвязь между категориями экспертных оценок качества. Например, техническая характеристика продукции коррелирует с профессиональной репутацией коллектива ($R^2 = 0.74$; $n = 421$), а репутация, в свою очередь, зависит от опыта выполнения работ ($R^2 = 0.73$; $n = 421$). Такая корреляция вполне закономерна, что позволило в дальнейшем использовать сумму баллов всех трех экспертных категорий в качестве единой оценки научной составляющей проекта, представленного на конкурс.

На рис. 3 приведены данные, демонстрирующие корреляцию между научной составляющей конкурсных проектов и снижением цены заявок. Зависимость получена для 105 победивших в конкурсе заявок, поступивших от отобранных 49 активных участников. Если у нескольких заявок оценки научной составляющей совпадали, то соответствующие таким заявкам значения снижения цены усредняли (исключая выбросы). Поэтому, например, наименьшее снижение цены

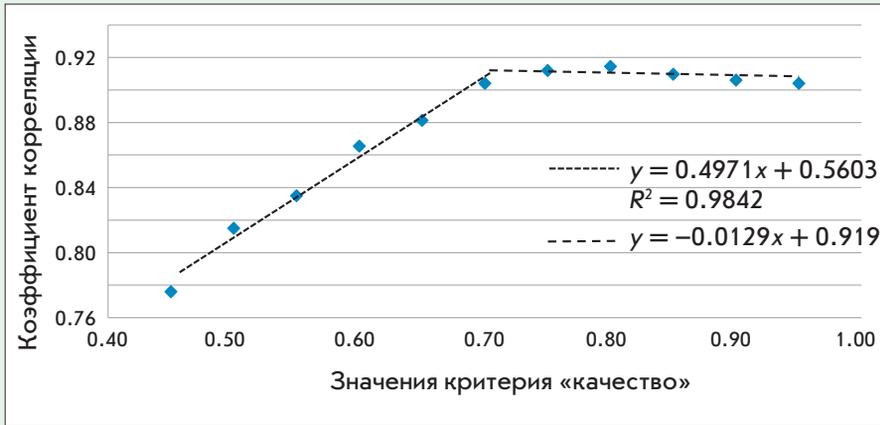


Рис. 4. Зависимость ранговой корреляции экспертного рейтинга с модельными рейтингами, полученными при различных весах критерия оценки качества заявок.

по данным *рис. 3* составляет 9% (а не 0%, как следует из гистограммы на *рис. 1*).

Аппроксимация данных линейной зависимостью, согласно формуле (2), позволила установить значение свободного члена $V = 96$ и поправочного множителя $a = -0.787$ и записать следующее выражение для расчета скорректированной оценки научной составляющей V' :

$$V' = 96 - 0.787 \times C. \quad (5)$$

Свободный член в формуле – это значение, предельное для балльной оценки научной составляющей заявки. Значение, полученное по результатам аппроксимации, практически совпадает с максимумом суммы баллов 100, установленным конкурсной документацией. Подставляя в формулу (5) значения, показанные на *рис. 3*, можно найти точку $V = 47$; $C = 60\%$, при которой скорректированная оценка научной составляющей равняется нулю. Это означает, что для заявок, цена которых снижена на 60% и более, риски ненадлежащего качества выполнения работ настолько высоки, что реализовать проект, по мнению экспертов, невозможно в принципе.

Полученные в результате аппроксимации скорректированные оценки научной составляющей подставляли в формулу (3) и рассчитывали для каждой заявки общий балл, суммирующий показатели «качество заявки» и «снижение цены». Заявки, поданные на каждый лот, пересчитывали в соответствии со значениями общего балла. Полученное ранжирование заявок рассматривали как экспертный рейтинг, т.е. рейтинг, порядок следования заявок в котором отражает коллективное мнение экспертов о зависимости между ценой заявки и ее качеством.

Экспертный рейтинг сравнивали с модельными рейтингами, полученными при различных значениях весов критериев цены и качества, например брали в качестве весов значения 0.4 и 0.6 соответственно. Веса использовали для расчета нового значения итоговой балльной оценки для всех заявок, после чего располагали заявки в составе каждого лота по мере уменьшения баллов. Такой модельный рейтинг сопоставляли с экспертным рейтингом, полученным с применением поправочного коэффициента. Сравнение проводили с использованием коэф-

фициента ранговой корреляции Спирмена (КРК), чувствительно к порядку следования элементов в отсортированных списках. В рассматриваемом случае, когда вес критерия качества задавали равным 0.6, значение КРК составило 0.865. Это значение указывает, что порядок следования заявок в экспертном рейтинге хорошо совпадает с модельным рейтингом при заданном соотношении цена/качество.

В другом случае, когда, например, при построении модельного рейтинга вес качества составлял только 0.4, а вес цены – 0.6, значение КРК было равно 0.75, т.е. существенно ниже, чем при рассмотренном ранее соотношении цена/качество 0.4/0.6.

На *рис. 4* показаны значения КРК для 11 модельных рейтингов, полученных при варьировании соотношении цена/качество. По оси ординат отмечены значения весов критерия качества в модельном рейтинге заявок, а по оси абсцисс – значения КРК, полученные в результате сравнения модельных рейтингов с экспертным. На *рис. 4* прослеживается четкая зависимость увеличения КРК по мере возрастания удельного веса качества при расчете итоговой оценки заявок. Увеличение значения коэффициента корреляции продолжается до уровня значений критерия «качество» 0.7, при котором КРК становится больше 0.9. Дальнейшее увеличение веса критерия качества не сказывалось существенным образом на значении КРК.

Как пример, на *рис. 4* показаны аппроксимирующие линии, пересекающиеся в точке с координатой по оси абсцисс 0.703(3). Наклон прямой, аппроксимирующей плато на графике, может варьировать в зависимости от количества точек, используемых для построения уравнения. Динамика увеличения КРК изменяется до достижения

уровня 0.7, поэтому данную величину целесообразно принять в качестве наименьшего значения веса, при котором достигается оптимальное совпадение модельного и экспертного рейтинга.

ВЫВОДЫ

Существует обратно пропорциональная зависимость между ценой и качеством работ, предлагаемых участниками конкурсов на НИР. Выполнение предлагаемых работ невозможно осуществить при планируемой

стоимости 60% и ниже начальной цены, предусмотренной конкурсной документацией. Законодательно закрепленный способ оценки и сопоставления заявок при размещении заказов на НИР не позволяет экспертам отдавать предпочтение заявкам участников размещения заказов, предполагающих проведение более качественных НИР. Эвристическим моделированием показано, что при ранжировании конкурсных заявок на НИР оптимальное соотношение цена/качество (т.е.

получение конкурентоспособных результатов при заданных объемах затрат бюджетных средств) будет достигаться при соотношении веса критериев цена и качество 0.30/0.70 соответственно. ●

Авторы выражают благодарность членам Рабочей группы по приоритетному направлению «Живые системы» и К. Тимирбаеву (корпорация «МетаСинтез») за участие в обсуждении статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. О размещении заказов на поставки товаров, выполнение работ, оказание услуг для государственных и муниципальных нужд: Федеральный закон от 21 июля 2005 г. № 94 – ФЗ. Собрание законодательства РФ. 2005. № 30. Ст. 3105.
2. Концепция федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы»: Распоряжение Правительства РФ от 6 июля 2006 г. № 977-р. Собрание законодательства РФ. 2006. № 29. Ст. 3258.
3. «Система госзакупок в сфере науки и образования требует радикальных изменений». Полит. Ру. URL: <http://www.polit.ru/news/2011/08/05/sg/>
4. Об утверждении Правил оценки заявок на участие в конкурсе на право заключить государственный или муниципальный контракт на поставки товаров, выполнение работ, оказание услуг для государственных или муниципальных нужд: Постановление Правительства РФ от 10 сентября 2009 г. № 722. Собрание законодательства РФ. 2009. № 38. Ст. 4477.
5. Мероприятие 1.2. «Проведение проблемно-ориентированных поисковых исследований и создание научно-технического задела по технологиям в области живых систем». ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы». URL: <http://www.fcpir.ru/catalog.aspx?CatalogId=1044>

Подписка на 2012 год Скидка 10%

+7 495 930-88-06

Подробности на сайте: www.actanaturae.ru

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ПАРАМЕТРЫ СТЕЙКИНГ-ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

Среди различных типов контактов в биомолекулярных комплексах (водородные связи, электростатические взаимодействия и др.) стейкинг ароматических фрагментов заслуживает особого внимания. Большинство лекарственных препаратов содержат ароматические циклы, и стейкинг часто играет важную роль в молекулярном узнавании рецептор-лиганд. Ранее мы показали [3], что явный учет стейкинг-взаимодействий существенно повышает эффективность моделирования АТФ. Стейкинг-контакты определяли функцией, зависящей от геометрических параметров взаимной ориентации двух ароматических фрагментов – высоты h и угла α между ними и длины d одного из колец относительно другого (рис. 1).

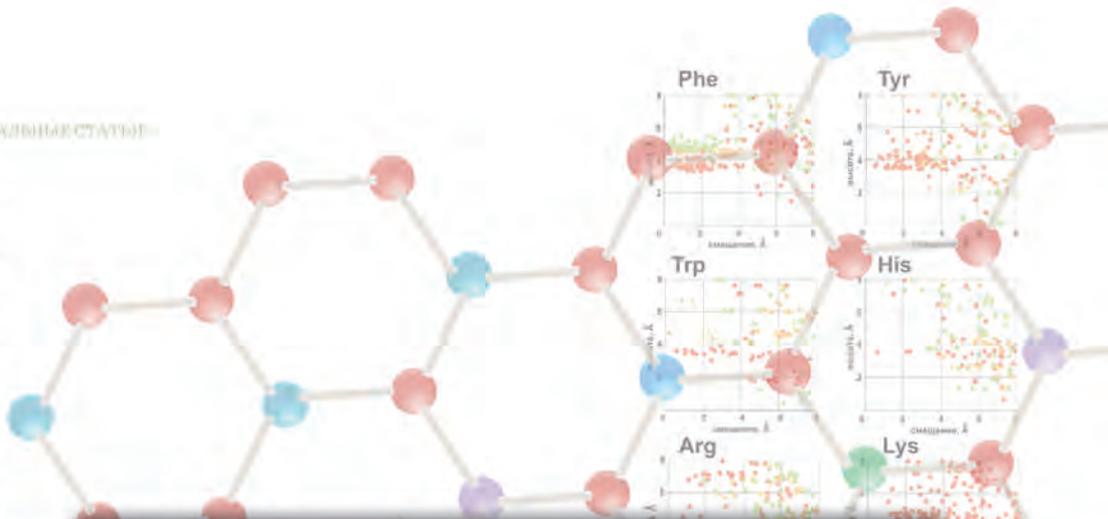
Диапазон этих параметров, определяющий наличие или отсутствие стейкинга, до сих пор остается не выясненным и в общепринятых критериях выбирается достаточно произвольно [6, 7]. Его уточнение могло бы повысить эффективность оценки качества и достоверности структур белок-лиганд, предсказываемых методами молекулярного моделирования. С этой целью мы провели анализ экспериментальной установленной пространственной структуры атомного разрешения для комплексов различных белков с лигандами, содержащими наиболее распространенные пуриновое основание – аденин и гуанин.

Известный пример стейкинг-взаимодействий – параллельная упаковка азотистых оснований нуклеотидов в ДНК [8, 9]. Но некоторые ароматические соединения стремятся расположиться не только параллельно, но еще и перпендикулярно друг другу, как это показано для аминокислот в белках [7, 10] и в модельных системах, состоящих из простых углеводородов – бензола, нафталина [11-14]. Кроме того, такие соединения имеют тенденцию участвовать в π - π -катионном взаимодействии, при котором образуется контакт между положительно заряженным группами и π -электронным облаком [15-17].

Поэтому мы исследовали распределение параметров h и d в зависимости от угла α относительно азотистого основания лиганда для ароматических боковых цепей остатков Phe, Tyr, Trp и His, а также для положительно заряженных гуанидиновой группы Arg и аминогруппы Lys. На рис. 2 приведены результаты для лигандов, содержащих гуанин.

Показано, что для остатка Phe характерны два альтернативных положения над плоскостью гуанинового кольца

Рис. 2. Геометрические параметры, с помощью которых описывают стейкинг-взаимодействие между двумя ароматическими кольцами. Смещение (d) и высота (h) центра одного из колец относительно другого кольца; угол (α) между нормалью к плоскостям колец.



АПРЕЛЬ-ИЮНЬ 2009 № 1

ActaNaturae

НЕПРИРОДНЫЕ АНТИТЕЛА

ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

РЕГУЛЯЦИЯ ТЕЛОМЕРАЗЫ
В ОНКОГЕНЕЗЕ

СТР. 58

СТРУКТУРА
МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА
ВОЗБУДИТЕЛЯ ОПИСТОРИХОЗА

СТР. 99

СТЕЙКИНГ-ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ
В КОМПЛЕКСАХ БЕЛКОВ
С АДЕНИН- И ГУАНИН-

УДК 577.271.34

Эскорт-аптамеры: новые инструменты для направленной доставки лекарственных препаратов в клетки

А. С. Давыдова, М. А. Воробьева*, А. Г. Веньямина

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8

*E-mail: maria.vorobjeva@gmail.com

Поступила в редакцию 08.07.2011 г.

РЕФЕРАТ Эскорт-аптамеры – фрагменты ДНК или РНК, которые обладают высоким сродством к определенным белкам на клеточной поверхности и могут использоваться для адресной доставки различных агентов в клетки конкретного типа. В обзоре обсуждены характерные особенности получения эскорт-аптамеров методом SELEX, рассмотрены методы селекции эскорт-аптамеров с использованием в качестве мишеней отдельных белков клеточной поверхности, фрагментов клеток, живых эукариотических клеток, бактерий. Отдельное внимание уделено дизайну и химическим модификациям эскорт-аптамеров. Описаны различные аспекты применения эскорт-аптамеров: направленная доставка малых интерферирующих РНК (siRNA), наночастиц, токсинов, фотореагентов и др.; идентификация специфических клеточных маркеров; детекция или выделение клеток определенного типа. Обсуждаются перспективы использования эскорт-аптамеров при разработке новых лекарственных средств и диагностических систем.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА метод SELEX, НК-аптамеры, эскорт-аптамеры, специфическое связывание с клетками, направленная доставка в клетки, детекция клеток.

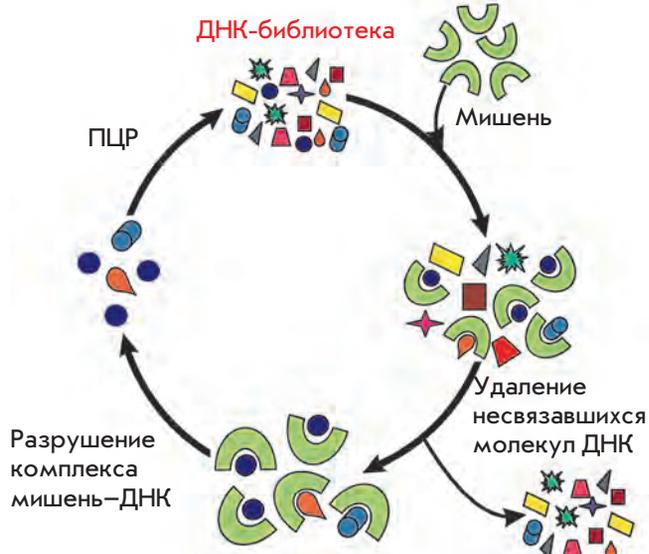
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ дцДНК – двухцепочечная ДНК; оцДНК – одноцепочечная ДНК; ПСМА – простат-специфичный мембранный антиген; ПЦР – полимеразная цепная реакция; IC_{50} – концентрация препарата, необходимая для подавления роста 50% клеток; K_d – кажущаяся константа диссоциации комплекса аптамер–мишень; LNA (Locked Nucleic Acids) – конформационно ограниченные нуклеиновые кислоты; SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment) – систематическая эволюция лигандов путем экспоненциального обогащения; siRNA (small interfering RNA) – малые интерферирующие РНК.

ВВЕДЕНИЕ

Аптамеры (от лат. *aptus* – подходить) – одноцепочечные молекулы ДНК и РНК, способные специфически узнавать определенные соединения благодаря уникальной пространственной структуре. Методы селекции *in vitro*, позволяющие получать нуклеиновые кислоты с заданными свойствами, были описаны независимо тремя группами исследователей в 1990 г. В работе А. Ellington и J. Szostak [1] получена молекула РНК, способная специфично связывать органический краситель. С. Tuerk и L. Gold описали селекцию молекул РНК, способных связывать ДНК-полимеразу фага Т4, и назвали разработанный метод SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment – систематическая эволюция лигандов путем экспоненциального обогащения) [2], а D. Robertson и G. Joyce использовали селекцию *in vitro* для конверсии рибозима группы I из рибону-

клеазы в дезоксирибонуклеазу [3]. В течение следующих двух десятилетий эта область стремительно развивалась, совершенствовались методы отбора аптамеров и подходы к их дизайну. В настоящее время получено большое количество аптамеров, способных высокоспецифично связывать самые разнообразные мишени (см. обзоры [4–7]). Благодаря своим уникальным свойствам – высокой аффинности и селективности связывания молекулы-мишени – аптамеры находят широкое применение в разнообразных областях исследований. В частности, на их основе могут быть получены высокоэффективные специфичные ингибиторы белков-мишеней, которые могут использоваться для создания новых лекарственных средств. На данный момент ряд аптамеров проходит различные стадии клинических испытаний [8], а препарат Macugen (компании «Eyetechnics Pharmaceuticals» и «Pfizer») на основе аптамера, связывающего

А



Б

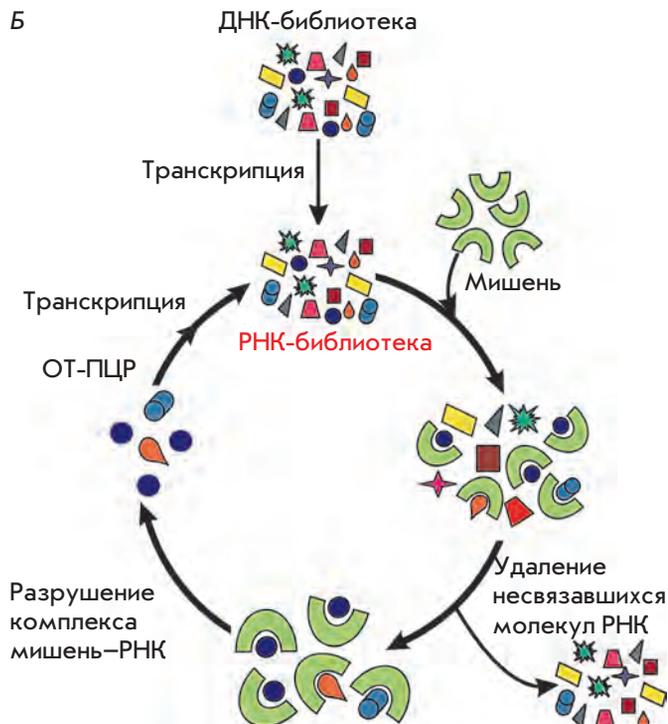


Рис. 1. Общая схема отбора аптамеров методом SELEX с использованием ДНК- (А) и РНК-библиотек (Б).

человеческий фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF), утвержден в качестве средства, эффективного при возрастной макулодистрофии [9, 10].

Одно из наиболее интересных и перспективных направлений в этой области – создание аптамеров, способных специфично узнавать клетки определенного типа благодаря связыванию с теми или иными доминантами на их поверхности. В обзоре В. Нике и соавт. [11] такие соединения были названы *эскорт-аптамерами*. Использование эскорт-аптамеров в качестве «адресующей» части открывает широкие возможности для направленной доставки агентов различной природы в клетки определенного типа. В настоящее время получено большое число эскорт-аптамеров, направленных на самые разнообразные клетки-мишени, и описан широкий спектр их приложений для специфического воздействия на клетки, диагностики и выделения клеток. Представленный обзор посвящен селекции, дизайну и различным аспектам применения эскорт-аптамеров.

ПОЛУЧЕНИЕ АПТАМЕРОВ МЕТОДОМ СЕЛЕКЦИИ *in vitro*

Общая схема метода SELEX

ДНК- и РНК-аптамеры получают селекцией *in vitro* из комбинаторных библиотек нуклеиновых кислот.

Классическая библиотека представляет собой набор олигонуклеотидов с рандомизированной областью из 20–60 нуклеотидов, фланкированной константными участками, необходимыми для связывания с праймерами и амплификации ДНК с помощью ПЦР. В настоящее время при отборе аптамеров широко используют как оцДНК-, так и РНК-библиотеки. РНК-аптамеры за счет 2'-ОН-групп способны образовывать больше разнообразных пространственных структур, чем ДНК-аптамеры. Однако при этом РНК-аптамеры более чувствительны к действию клеточных нуклеаз и нуждаются во введении дополнительных защитных групп [12].

оцДНК-библиотеки получают стандартными методами химического синтеза олигодезоксирибонуклеотидов, используя при синтезе рандомизированного участка смесь всех четырех мономеров. Для получения РНК-библиотеки сначала проводят химический синтез оцДНК-библиотеки, содержащей в 5'-концевой области промоторную последовательность для Т7-РНК-полимеразы, а затем на матрице оцДНК получают дцДНК, которую используют для синтеза РНК методом транскрипции *in vitro*. Общая схема метода SELEX для ДНК-библиотек состоит из следующих стадий: инкубирование библиотеки с мишенью, отделение комплексов олигонуклеотид-мишень от несвязавшихся олигонуклеотидов, разрушение

комплексов олигонуклеотид–мишень и амплификация связавшихся молекул (рис. 1А). При отборе РНК-аптамеров в SELEX включаются дополнительные стадии наработки РНК-библиотеки по матрице ДНК, обратной транскрипции связавшихся молекул РНК для получения кДНК и ее последующей амплификации (рис. 1Б).

В процессе отбора происходит обогащение библиотеки последовательностями, имеющими повышенное сродство к мишени. Как правило, для получения аптамеров проводят от 5 до 15 раундов селекции в зависимости от значений константы диссоциации комплекса аптамер–мишень. После того как константа диссоциации перестает снижаться (т.е. сродство библиотеки к мишени перестает увеличиваться), обогащенную библиотеку клонируют и определяют последовательности индивидуальных аптамеров. Затем анализируют гомологию между индивидуальными аптамерами, по результатам анализа аптамеры группируют в несколько классов и оценивают их способность взаимодействовать с мишенью. Для дальнейших исследований отбирают последовательности с максимальным сродством к мишени. Вторичную структуру аптамеров изучают с использованием анализа консервативных мотивов, компьютерного моделирования, химического и ферментативного пробинга. На следующем этапе определяют минимальный размер аптамера, необходимый для специфичного узнавания мишени. С этой целью синтезируют серию укороченных вариантов аптамера и определяют их способность связываться с мишенью.

Как правило, аптамеры обладают высоким сродством к своим мишеням. Характерные значения константы диссоциации (K_d) для белковых мишеней лежат в наномолярном и субнаномолярном диапазоне (1×10^{-10} – 1×10^{-7} М). По своей аффинности и специфичности аптамеры сравнимы с моноклональными антителами, но при этом они обладают целым рядом выгодных отличий (см. табл. 1), среди которых стоит особо выделить возможность химического синтеза и химической модификации аптамеров.

Химические модификации аптамеров

Введение в состав эскорт-аптамеров различных модификаций позволяет существенно повысить их стабильность в биологических средах, а также дает возможность дополнительной функционализации аптамеров. Наиболее распространенная модификация, используемая для повышения устойчивости аптамеров, – введение различных заместителей по 2'-положению рибозы (рис. 2), позволяет защитить аптамеры от расщепления эндонуклеазами. Как правило,

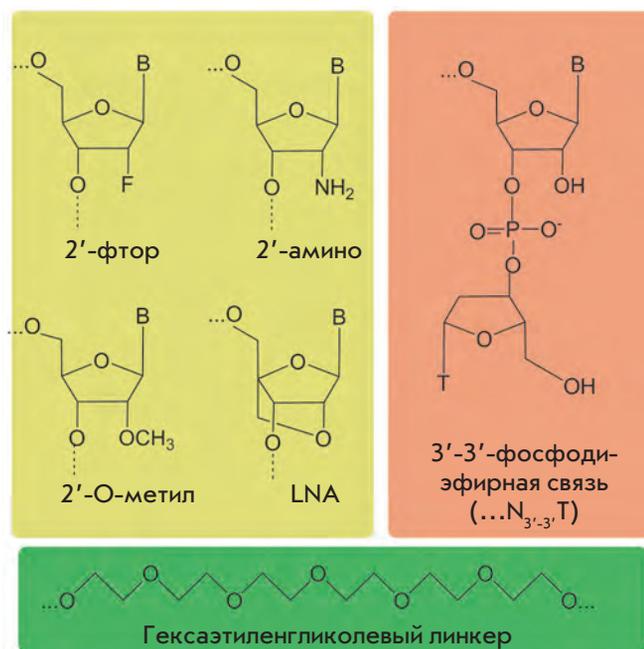


Рис. 2. Химические модификации рибозофосфатного остова, используемые для повышения устойчивости эскорт-аптамеров в биологических средах.

такого рода модификации используют для защиты эскорт-РНК-аптамеров, в то время как эскорт-ДНК-аптамеры чаще применяют без дополнительных модификаций. Основным путем деградации РНК-аптамеров в биологических средах является их расщепление пиримидиновыми эндорибонуклеазами, поэтому уже на стадии конструирования комбинаторных РНК-библиотек для отбора эскорт-аптамеров пиримидиновые нуклеозиды в их составе заменяют их 2'-фтор- и 2'-амино-аналогами, используя при синтезе библиотеки соответствующие модифицированные нуклеозидтрифосфаты. Для их включения в растущую цепь РНК может быть использована Т7-РНК-полимераза [13] или ее мутантная версия, способная включать эти 2'-модифицированные нуклеозидтрифосфаты в РНК с большей эффективностью [14]. Существует также мутантная РНК-полимераза, включающая в РНК 2'-О-метил-аналоги нуклеозидтрифосфатов [15, 16], однако из-за проблем, связанных с реакцией обратной транскрипции 2'-О-метилсодержащих РНК, использование 2'-О-метил-РНК-библиотек непосредственно в процессе селекции пока не получило широкого распространения [4].

Для получения 2'-О-метилсодержащих аптамеров часть рибонуклеотидов в составе РНК-аптамера заменяют их 2'-О-метил-аналогами уже после отбора

Таблица 1. Сравнение свойств НК-аптамеров и моноклональных антител

	Аптамеры	Моноклональные антитела
Способ отбора	Селекция <i>in vitro</i>	Гибридная технология, включающая иммунизацию животных
Способ синтеза	Химический или ферментативный синтез	Производство с использованием клеточных культур или лабораторных животных
Ограничения на молекулы-мишени	Отсутствуют	Невозможно получить антитела на неиммунные или токсичные соединения
Сродство к мишени	$K_d \approx 10^{-10} - 10^{-7}$ М	$K_d \approx 10^{-10} - 10^{-7}$ М
Специфичность	Высокая	Высокая
Стабильность	Могут ренатурировать после нагревания, возможно длительное хранение	Необратимая денатурация при нагревании, более чувствительны к условиям хранения
Иммуногенность	Не показана	Высокая
Возможности введения химических модификаций	Широкие	Ограниченные

аптамеров и установления их нуклеотидной последовательности. Также для повышения устойчивости аптамеров с уже известной последовательностью в их состав вводят 2'-О, 4'-С-метиленбициклические нуклеотиды (LNA, locked nucleic acids), причем эту модификацию используют как в РНК- [17], так и в ДНК-аптамерах [18]. С целью минимизации длины аптамеров и одновременного повышения их устойчивости к эндонуклеазам может быть использована замена части нуклеотидов гибким линкером на основе этиленгликоля [18, 19]. Для защиты аптамеров от расщепления 3'-эксонуклеазами используют кепирование 3'-конца дополнительным остатком тимидина, присоединенным 3'-3'-фосфодиэфирной связью [17, 19].

Для введения в состав аптамеров дополнительных функциональных групп в ходе селекции используют либо модифицированные нуклеозидтрифосфаты, либо модифицируют уже «готовые» аптамеры (см. обзор [4]). В случае эскорт-аптамеров наиболее распространено введение на 5'- или 3'-конец аптамера алифатической амино- или сульфгидрильной группы, что позволяет синтезировать разнообразные конъюгаты аптамеров с токсинами, антибиотиками, флуоресцентными или фотореакционноспособными группами, наночастицами и др. (см. раздел «Применение эскорт-аптамеров»).

Необходимо учитывать, что введение модификаций в уже «готовый» аптамер может привести к значительным изменениям конформации молекулы и понизить сродство аптамера к мишени. Поэтому в каждом случае надо тщательно выбирать вид и положение таких модификаций и дополнительно

исследовать их влияние на сродство аптамера к мишени.

ПОЛУЧЕНИЕ ЭСКОРТ-АПТАМЕРОВ

В качестве мишеней при отборе эскорт-аптамеров методом селекции *in vitro* используют индивидуальные белки клеточной поверхности или же целые клетки. Использование клеток в качестве мишеней обладает рядом преимуществ по сравнению с использованием очищенных белков:

- отсутствует необходимость наработки чистого белка, служащего мишенью;
- полученные аптамеры обладают высоким сродством к целевым клеткам;
- можно проводить селекцию на клетку в целом, даже если конкретный поверхностный белок-мишень заранее не известен;
- появляется возможность идентификации новых, ранее неизвестных специфических маркеров на поверхности клеток.

Для протокола клеточной селекции эскорт-аптамеров характерны свои особенности. Одну из ключевых проблем при использовании клеток в качестве мишеней представляет огромное число поверхностных доминант – как уникальных для данного типа клеток, так и общих для клеток многих типов. Чтобы исключить из отбора неспецифические аптамеры, связывающиеся с общими для многих типов клеток молекулярными мишенями, в SELEX вводят дополнительную стадию контрселекции, или негативной селекции. Так, при отборе аптамеров, способных связываться с тем или иным белком на поверхности клеток, используют две клеточных линии, одна

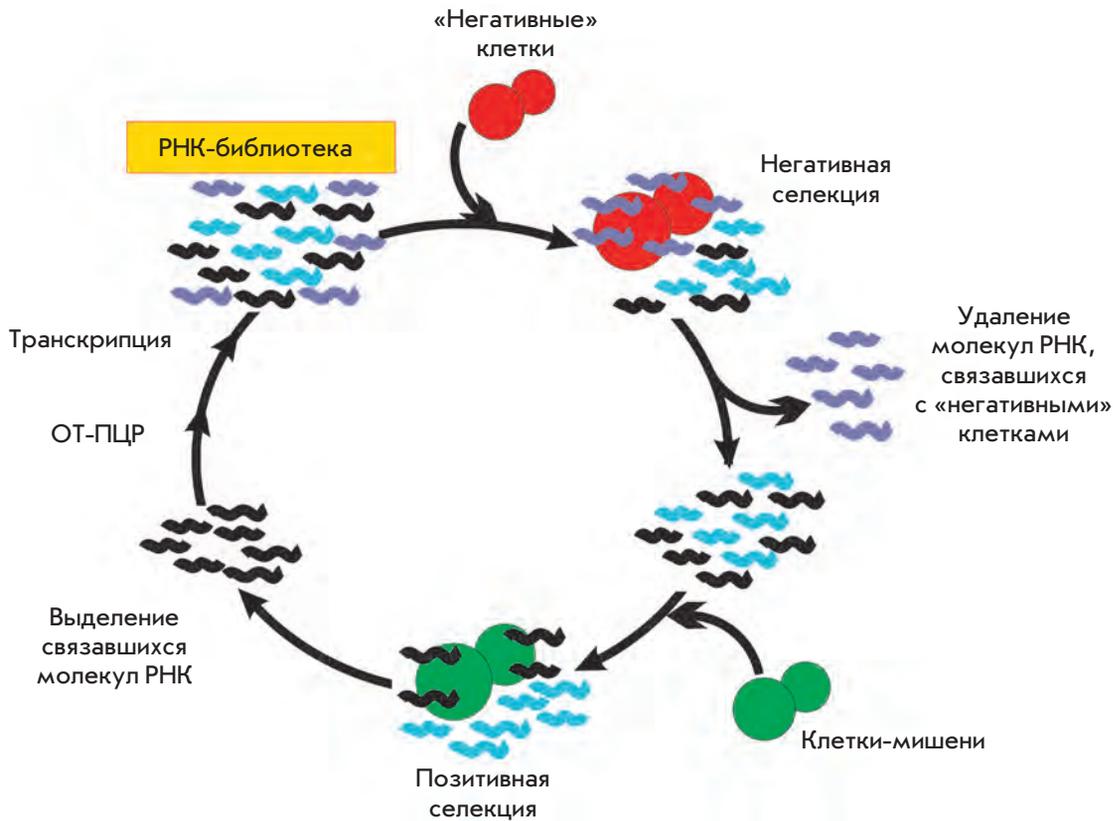


Рис. 3. Схема селекции *in vitro* на клетки с использованием стратегии отрицательной селекции на примере РНК-библиотеки.

из которых (клетки-мишени) экспрессирует нужный белок, а вторая (контрольные «негативные» клетки) представляет собой клетки того же типа, не экспрессирующие этот белок. Последовательная инкубация библиотеки нуклеиновых кислот с контрольными клетками и клетками-мишенями позволяет отобрать те последовательности, которые связывают на поверхности клеток только нужный белок.

Общая схема клеточной селекции эскорт-аптамеров (на примере РНК-библиотеки) представлена на рис. 3. Исходную библиотеку олигонуклеотидов инкубируют с контрольными клетками, отделяют несвязавшиеся молекулы, затем инкубируют их с клетками-мишенями и снова отделяют несвязавшиеся молекулы. После этого клетки разрушают, выделяют связавшиеся аптамеры, амплифицируют их и используют на следующем раунде селекции.

Впервые использование клеток в качестве мишеней для селекции *in vitro* описано в работе К. Morris и соавт. [20], в которой получены ДНК-аптамеры, узнающие тени эритроцитов человека – клетки, лишенные гемоглобина, но сохраняющие мембрану той же формы, что и нативные эритроциты. Для получения аптамеров оцДНК-библиотеку инкубировали с клетками-мишенями, связавшиеся последовательности отделяли с помощью фильтрования на нитроцеллюлозных фильтрах, а затем получен-

ный набор молекул ДНК амплифицировали и использовали в следующем раунде селекции. После 25 раундов селекции два аптамерных мотива составляли около 25% от всего числа клонов. С использованием фотоактивируемых фенилазидных группировок, введенных в состав этих двух аптамеров, показано, что они связывают различные молекулярные мишени на клеточной поверхности. Эта работа стала первым примером использования комбинаторных библиотек нуклеиновых кислот для отбора аптамеров на такие сложные объекты, как клеточная мембрана.

Аптамеры, узнающие злокачественные клетки

Подавляющее большинство работ по отбору аптамеров к живым клеткам посвящено поиску последовательностей, способных специфично связываться со злокачественными клетками. Так, в работе S. Lupold и соавт. [21] описано получение 2'-F-модифицированных РНК-аптамеров, способных связывать простатспецифичный мембранный антиген (ПСМА). Этот белок, расположенный на поверхности клеточной мембраны, является маркером опухолевых клеток предстательной железы. Клетки здоровых тканей характеризуются очень низким уровнем ПСМА, а при развитии злокачественных опухолей его уровень значительно возрастает. В качестве мишени при получении аптамеров использовали не це-

лые опухолевые клетки, а рекомбинантный белок, соответствующий внеклеточному домену ПСМА. Уже после шести раундов селекции обогащенная библиотека на 95% состояла из двух последовательностей РНК (**A9** и **A10**). В результате минимизации длины аптамера **A10** получен 56-звенный аптамер **A10-3**, на 3'-конец которого для защиты от экзонуклеаз через 3'-3'-фосфодиэфирную связь введен дополнительный остаток тимидина. Показано, что этот аптамер специфически связывается с раковыми клетками LNCaP, экспрессирующими ПСМА, и не связывается с клетками РС-3 рака предстательной железы, в которых этот белок не экспрессируется.

Использование в качестве мишеней фрагментов индивидуальных поверхностных белков описано и в работах С. Ferreira и соавт. [22–24], посвященных отбору ДНК-аптамеров к опухолевому маркеру – поверхностному гликопротеину муцину (MUC1), гиперэкспрессия которого характерна для раковых клеток. Мишенями для отбора служили иммуногенные синтетические пептиды – фрагменты муцина, иммобилизованные на колонке с функционализированной сефарозой. После 10 раундов селекции получили 12 аптамерных последовательностей, одна из которых (аптамер **S1.3/S2.2**) обладала способностью связываться с опухолевыми клетками, продуцирующими муцин [23]. Этим же способом, но с использованием в качестве мишени рекомбинантного муцина, получены еще четыре ДНК-аптамера [22]. Наиболее удачным оказался третий вариант, отобранный на миметик муцина, О-гликозилированный пептид [24]. Полученный этим способом ДНК-аптамер **5TRG2**, обладающий наиболее высоким сродством к пептиду-мишени ($K_d = 18.6$ нМ), был способен не только селективно связываться с муцином на поверхности клеток, но и проникать внутрь клеток за счет рецептор-опосредованного эндоцитоза.

Надо отметить, что более надежным и эффективным способом получения аптамеров, способных связываться с белками на клеточной поверхности, считается селекция на целые клетки. Так, в работе D. Daniels и соавт. [25] описана селекция ДНК-аптамеров, способных связываться с поверхностью клеток глиобластомы U251. После 21 раунда селекции был отобран аптамер **GBI-10**, который вместе со своими гомологами составлял около 10% от всего количества отобранных последовательностей. Методом аффинной очистки клеточного экстракта с использованием иммобилизованного на магнитных частицах аптамера **GBI-10** было установлено, что его мишенью является тенасцин С (TN-C) – белок, локализованный преимущественно во внеклеточном матриксе, гиперэкспрессия которого характерна для широкого спектра опухолей. Селекцию вели при 4°C, чтобы

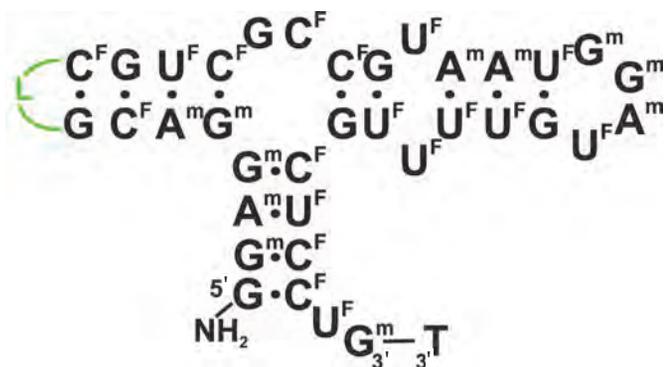


Рис. 4. Предполагаемая вторичная структура модифицированного аптамера **TTA1**, связывающегося с тенасцином С [19]. Обозначения: N^F – 2'-фтор-2'-дезоксирибонуклеотид, N^m – 2'-О-метилрибонуклеотид, NH₂ – остаток аминоксанола, L – гексаэтиленгликольфосфатный линкер.

избежать проникновения аптамеров внутрь клеток, а также снизить степень деградации аптамеров. Кажущаяся константа диссоциации комплекса аптамер–тенасцин С в этих условиях составляла 150 нМ, а при повышении температуры от 4 до 37°C значение K_d увеличивалось примерно на порядок.

Образующие значительно более стабильные комплексы 2'-F-РНК-аптамеры к тенасцину С были получены с применением трех параллельных протоколов селекции *in vitro*. В первом случае в качестве мишени использовали рекомбинантный белок, во втором – клетки глиобластомы U251, а в третьем случае использовали перекрестную селекцию, в рамках которой после 9 раундов селекции на клетки глиобластомы проводили два дополнительных раунда селекции на белок TN-C [19]. Для повышения устойчивости в биологических средах все пиримидиновые нуклеозиды в составе РНК-библиотеки заменили их 2'-F-аналогами. Аптамеры, отобранные всеми тремя способами, обладали достаточно высоким сродством к TN-C ($K_d = 1–10$ нМ), причем аптамеры, полученные селекцией на индивидуальный белок, и аптамеры, полученные селекцией на клетки, содержали сходные последовательности. 55-Звенный аптамер **TN-9** был укорочен на 16 нуклеотидов, а в его состав ввели ряд дополнительных химических модификаций: заменили несколько нуклеотидов гексаэтиленгликолевым линкером, большинство пуриновых остатков 2'-О-метил-аналогами, кепировали 3'-конец остатком тимидина, присоединенного 3'-3'-фосфодиэфирной связью, и ввели на 5'-конец аминогруппы для создания биоконъюгатов. Полученный модифицированный аптамер **TTA1** (рис. 4) сохранял высокое сродство к белку-мишени ($K_d = 5$ нМ) и обладал высокой биологической стабильностью.

W. Tan с сотр. получили ДНК-аптамеры, связывающиеся с клетками CCRF-CEM Т-клеточного лейкоза [26]. В качестве контрольных клеток на стадии контрселекции использовали В-клетки лимфомы Беркитта (так называемые Ramos-клетки). Полученные высокоаффинные аптамеры были способны не только селективно связывать клетки-мишени CCRF-CEM, но и распознавать их в смеси с опухолевыми клетками других линий, а также с клетками костномозговой жидкости здоровых людей [27]. Оказалось, что 88-звенный аптамер *sgc8*, обладающий наибольшим сродством к клеткам-мишеням ($K_d = 0.8$ нМ), связывается на их поверхности с тирозиновой протеинкиназой 7 (РТК-7) [28], которая участвует в процессах передачи сигнала при развитии и метастазировании злокачественных опухолей. Кроме того, аптамер *sgc8* способен проникать внутрь клеток CCRF-CEM, где он затем локализуется в эндосомах [29]. В результате минимизации нуклеотидной последовательности аптамера *sgc8* и введения в его структуру химических модификаций (рис. 5) получен содержащий 33 нуклеотида и линкер аптамер **C8FL**, обладающий исключительной устойчивостью к нуклеазам сыворотки и высоким сродством к клеткам-мишеням ($K_d = 1.53$ нМ) [18].

В 2009 г. А. Ellington с сотр. [30] изучили специфичность связывания ряда клеточных аптамеров и, в частности, показали, что аптамеры к клеткам CCRF-CEM способны узнавать злокачественные клетки других типов, для которых характерна способность формировать монослой. Авторы предположили, что полученные в работах W. Tan с сотр. [26–29] аптамеры специфично узнают не клетки лейкоза определенного типа, а клетки, способные к адгезии. В пользу этого предположения приведены следующие аргументы: 1) тирозиновая протеинкиназа 7 (РТК-7) участвует в процессах клеточной адгезии; 2) в ходе селекции мишенями служили клетки CCRF-CEM, способные к образованию монослоя, а негативным контролем для контрселекции – Ramos-клетки, которые монослой не образуют, т.е. потенциально существовала возможность отбора аптамеров к клеткам, способным к адгезии. Надо отметить, однако, что в описанных выше опытах использовали не аптамер *sgc8*, а гомологичный ему *sga16*, сродство которого к клеткам-мишеням на порядок ниже, чем у *sgc8*. Таким образом, нельзя однозначно утверждать, что все полученные в работах W. Tan с сотр. [26–29] аптамеры неспецифичны по отношению к клеткам CCRF-CEM.

Ramos-клетки W. Tan с сотр. [31, 32] использовали не только в качестве контрольных клеток, но и как мишени для отбора, причем в этом случае стадия контрселекции в цикл SELEX не входила [31].

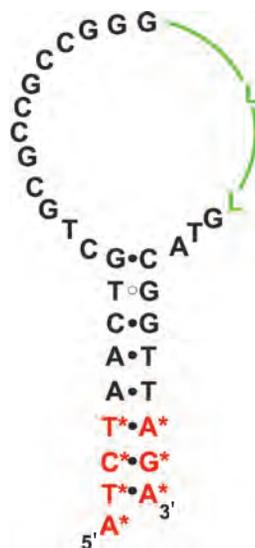


Рис. 5. Предполагаемая вторичная структура модифицированного аптамера **C8FL** к клеткам CCRF-CEM [18]. Обозначения: **L** – гексаэтиленгликольфосфат, **N*** – LNA-нуклеотиды.

Было показано, что молекулярной мишенью аптамеров на поверхности Ramos-клеток служит связанная с мембраной тяжелая цепь иммуноглобулина М [32]. Существенным недостатком этих аптамеров была их способность связываться с клетками-мишенями только при пониженных температурах (селекцию проводили при 4°C), а также потенциальная возможность связывания не только IgM на клеточной поверхности, но и растворимых IgM в плазме крови. Для решения этих проблем проведена минимизация структуры аптамера **TD05** (укорочение нуклеотидной последовательности с 48 до 37 нуклеотидов) в сочетании с заменой четырех дезоксирибонуклеотидов с 3'-конца их LNA-аналогами [33], а затем на основе «укороченных» модифицированных аптамеров **TD05.17** созданы три- и тетрамерные конструкции, в которых аптамерные последовательности соединены ненуклеотидными полиэтиленгликолевыми вставками (см., например, рис. 6). Полученные мультимеры специфично связывались с Ramos-клетками при 37°C ($K_d = 256$ нМ для тримера и 272 нМ для тетрамера), узнавая тяжелые цепи IgM на клеточной поверхности, и не взаимодействовали с растворимыми IgM.

W. Tan с сотр. получили также ДНК-аптамеры, способные различать две близкородственные линии клеток острого миелоидного лейкоза [34], клетки мелкоклеточного и немелкоклеточного рака легкого [35], а также клетки рака печени и нормальные гепатоциты [36].

М. Blank и соавт. [37] получены ДНК-аптамеры, которые селективно узнают микрососуды опухоли головного мозга крысы и не связываются со здоровыми сосудами. В ходе исследования ДНК-библиотеку инкубировали сначала с контрольными клетками –



Рис. 6. Предполагаемая вторичная структура тримера на основе модифицированного аптамера **TD05.17** к Ramos-клеткам [33]. Обозначения: **L** – гексаэтиленгликольфосфат, **N*** – LNA-нуклеотиды.

микроглиальными клетками N-9 (моноциты мозга), а затем с клетками-мишенями – иммортализованными эндотелиальными клетками YPEN-1 крысы, трансформированными гибридным вирусом SV40. После селекции *in vitro* определяли специфичность связывания клеток-мишеней и контрольных клеток каждым клоном и проводили гистохимическое окрашивание опухолевых сосудов. Оказалось, что молекулярной мишенью наиболее активного аптамера **III.1** (рис. 7) является эндотелиальный белок *rigren*, синтез которого усиливается в мигрирующих и активно делящихся эндотелиальных клетках. По мнению авторов, этот белок можно рассматривать в качестве нового диагностического маркера ангиогенеза, а также потенциальной молекулярной мишени для блокирования ангиогенеза опухолей.

В 2011 г. опубликована работа E. Zueva и соавт. [38], посвященная поиску аптамеров, способных отличать высокоподвижные метастазирующие злокачественные клетки от злокачественных клеток с низкой подвижностью. Для отбора 2'-F-содержащих РНК-аптамеров использовали две линии трансформированных фибробластов сирийского хомячка: контрольную линию с низкой подвижностью и линию клеток-мишеней с высокой подвижностью. Аптамеры **E10** и **E37** специфично и с высоким сродством связывались с метастазирующими клетками (значения K_d составили 37 и 50 нМ соответственно) и в концентрации 100 нМ подавляли миграцию клеток, а в случае аптамера **E10** – и клеточную инвазию. Показана способность аптамера **E37** проникать внутрь клеток.

В работе J. Mi и соавт. [39] описан отбор аптамеров к клеткам метастазов колоректального рака в печень. Примечательно, что в процессе отбора использовали не культуру клеток, а модельных животных:

2'-F-содержащую РНК-библиотеку внутривенно вводили мышам с предварительно привитой опухолью печени, а затем из печени выделяли связавшиеся 2'-F-РНК. Полученный аптамер **14-16** после внутривенного введения мышам селективно связывался с внутрипеченочными опухолями. Этот аптамер обладал способностью проникать внутрь опухолевых клеток и связываться в ядре и цитоплазме с геликазой р68, гиперэкспрессия которой характерна для колоректального рака. На данный момент эта работа является единственным примером отбора аптамеров с использованием многоклеточных организмов.

Аптамеры, связывающиеся с поверхностными рецепторами клеток

Клеточные рецепторы считаются привлекательной терапевтической мишенью. Они могут быть нейтрализованы с помощью аптамеров, блокирующих лиганд-индуцируемую активацию. Создание аптамеров, способных специфически блокировать определенные рецепторы и «выключать» тем самым соответствующие сигнальные пути, дает возможность как изучения молекулярных механизмов их функционирования, так и диагностики и терапии различных заболеваний. Нескольким исследовательским группам удалось получить аптамеры, способные связываться с клеточными рецепторами.

В качестве мишеней для получения рецепторузнающих аптамеров в ряде случаев использовали рекомбинантные белки, соответствующие внеклеточным доменам рецепторов. Этим способом получили 2'-фторсодержащие РНК-аптамеры, способные узнавать рецепторы CD4 крысы [40] и человека [41], а также рецептор CTLA-4 мыши [42]. С. Chen и соавт.

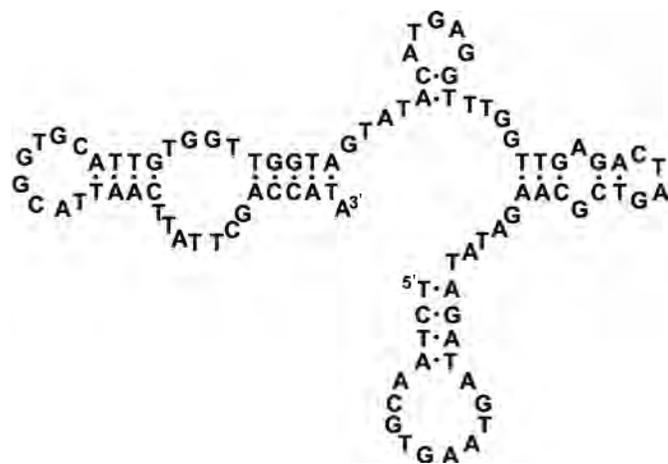


Рис. 7. Предполагаемая вторичная структура ДНК-аптамера **III.1** к микрососудам опухоли мозга крысы [37].

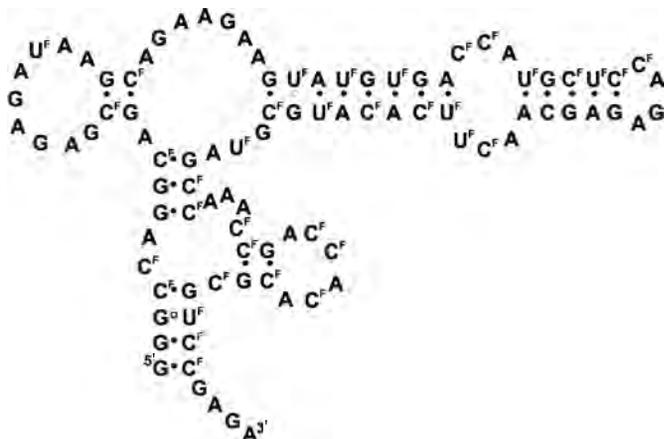


Рис. 8. Предполагаемая вторичная структура РНК-аптамера **A07** к рецептору трансформирующего фактора роста человека [44]. Обозначения: N^F – 2'-фтор-2'-дезоксирибонуклеотид.

[43] описано получение аптамеров к трансферриновому рецептору мыши. На примере флуоресцентно меченных конъюгатов РНК- и ДНК-аптамеров со стрептавидином показана способность аптамеров проникать в клетки путем эндоцитоза. При этом связывание аптамеров с трансферриновым рецептором не влияло на взаимодействие с этим рецептором самого трансферрина, т.е. такие аптамеры могут использоваться для доставки лекарственных средств без блокирования функций рецептора, необходимого для жизнедеятельности клеток.

С применением метода SELEX на целые клетки, включающего стадию контрсеlections, были отобраны 2'-F-содержащие РНК-аптамеры на рецептор трансформирующего фактора роста человека β (TGF- β) типа III (TbRIII), экспрессированный на поверхности клеток яичника китайского хомячка (CHO) [44]. На стадии негативного отбора в этой работе использовали «родительские» клетки CHO, не экспрессирующие данный белок. После селекции получили аптамер **A07** (рис. 8), специфически связывающийся с рецептором TbRIII и образующий с ним прочный комплекс ($K_d = 2.47$ нМ). Показано также, что данный аптамер способен ингибировать ассоциацию рецептора TbRIII и его лиганда TGF- β_2 .

В работе L. Cerchia и соавт. [45] описана селекция 2'-F-РНК-аптамеров, связывающихся с мутантной димерной формой рецепторной тирозинкиназы человека RET^{C634Y}, присутствие которой характерно для множественной эндокринной неоплазии типа II. В процессе отбора библиотеку инкубировали с клетками, экспрессирующими мутантную форму рецеп-

тора RET^{C634Y} (PC12/MEN2A). На стадии контрсеlections библиотеку олигонуклеотидов инкубировали с контрольными клетками двух типов – «родительскими» PC12, не экспрессирующими белок-мишень, и клетками PC12/MEN2B, которые имели сходную с PC12/MEN2A морфологию, но экспрессировали мономерную форму рецепторной тирозинкиназы RET^{M918T}. Аптамеры **D4** и **D24**, полученные после 15 раундов селекции, эффективно связывались с клетками-мишенями ($K_d = 40$ нМ) и в концентрации 200 нМ подавляли активность RET на 70%. Необходимо отметить, что аптамер **D4** связывался и с клетками PC12/MEN2B, хотя степень связывания была значительно меньше (примерно в 2.5 раза по сравнению с клетками-мишенями PC12/MEN2A).

Использование метода перекрестной селекции для получения аптамеров на рецептор RET^{C634Y} (семь раундов отбора на клетки PC12/MEN2A и четыре раунда отбора на очищенный рекомбинантный белок [46]), к сожалению, не привело к лучшему результату. Полученный таким способом аптамер **E38** значительно отличался по своей структуре от аптамеров на клетки-мишени, характеризовался более низким сродством к клеткам PC12/MEN2A ($K_d = 100$ нМ) и не ингибировал активность рецепторной тирозинкиназы.

Аптамеры, способные узнавать недифференцированные клетки

Интересную задачу представляет получение аптамеров, связывающихся с недифференцированными клетками. Так, в работе С. Wang и соавт. [47] отбирали ДНК-аптамеры, способные различать дифференцированные клетки PC12 и «родительские» недифференцированные клетки, использованные в качестве контрольных на стадии контрсеlections. Шести раундов селекции оказалось достаточно для того, чтобы полученные аптамеры узнавали дифференцированные клетки и не связывались с недифференцированными. Аптамеры на недифференцированные типы клеток, например, на стволовые клетки, можно использовать для выделения и очистки клеток в такой быстро развивающейся области, как регенеративная медицина. Созданию ДНК-аптамеров для выделения и иммобилизации клеток посвящены работы К. Guo и соавт. [48, 49]. В частности, получены ДНК-аптамеры [49], связывающие зрелые мезенхимные стволовые клетки. После 12 раундов отбора без контрсеlections получены аптамеры, способные селективно узнавать клетки-мишени среди других костномозговых клеток, и показана возможность их использования для выделения стволовых клеток из костного мозга. J. Hoffmann и соавт. [50] получили ДНК-аптамеры, способные связываться с предше-

стенниками эндотелиальных клеток свиньи, которые затем использовали для иммобилизации клеток на поверхности дисков из политетрафторэтилена или полидиметилсилоксана (см. раздел «Применение эскорт-аптамеров»).

Идентификация новых биомаркеров в результате клеточной селекции аптамеров

Селекция аптамеров *in vitro* с использованием живых клеток позволяет после отбора аптамеров и обнаружения поверхностных белков, с которыми они связываются, идентифицировать новые биомаркеры, характерные для клеток определенного типа. Существующие в настоящее время методы поиска биомаркеров (Вестерн-блоттинг, скрининг мРНК с использованием количественной ПЦР или чипов, двумерный электрофорез в сочетании с масс-спектроскопией) недостаточно эффективны, и их общий недостаток – возможность как ложноположительных, так и ложноотрицательных результатов. Стратегия поиска биомаркеров при помощи аптамеров (AptaBiD, Aptamer-facilitated Biomarker Discovery), сформулированная в общем виде в работе M.V. Berezovski и соавт. [51], позволяет решить эти проблемы. Вероятность ложноположительных результатов снижается в результате многочисленных раундов селекции, которые исключают влияние на отбор случайных факторов, таких, как стохастические различия между клетками одного и того же типа, а также случайные вариации на всех стадиях обработки клеток. В то же время экспоненциальное обогащение библиотеки в процессе селекции дает возможность выявить даже незначительные различия между контрольными клетками и клетками-мишенями, если они сохраняются от раунда к раунду, а это снижает вероятность получения ложноотрицательных результатов. Чтобы подтвердить перспективность стратегии AptaBiD, ее использовали для поиска биомаркеров, определяющих различия между зрелыми и незрелыми дендритными клетками. В результате обнаружили как ранее известные биомаркеры дендритных клеток, так и шесть новых биомаркеров незрелых дендритных клеток. Надо отметить, что особенность этого метода состоит в отсутствии стадий клонирования и секвенирования – для поиска биомаркеров используют не индивидуальные аптамеры, а обогащенные библиотеки, что позволяет сделать процесс более быстрым и менее затратным.

Аптамеры, узнающие поверхностные белки микроорганизмов

В качестве мишеней для клеточной селекции можно использовать не только культивируемые клетки, но и патогенные микроорганизмы. Полученные таким

способом аптамеры в дальнейшем могут применяться в диагностике и терапии инфекционных заболеваний, а также для количественного определения микроорганизмов.

В работе M. Homann и H. Göringer [52] получены РНК-аптамеры, способные связываться с живыми трипаносомами *Trypanosoma brucei* – паразитическими простейшими, возбудителями сонной болезни. В качестве мишеней для отбора использовали два штамма *Tr. brucei*. РНК-библиотеку инкубировали с паразитами, находящимися на стадии кровяного русла (bloodstream-stage), а несвязавшиеся молекулы удаляли центрифугированием. Полученные аптамеры связывались с особями обоих штаммов на стадии кровяного русла ($K_d = 60$ нМ) и не узнавали *Tr. brucei* на других стадиях развития. Методами фотоаффинной модификации и флуоресцентной микроскопии с использованием флуоресцентно меченного аптамера **2-16** установлено, что его мишенью служит белок с молекулярной массой 42 кДа, находящийся в жгутиковом кармане трипаносомы. После связывания с этим белком аптамер проникает в трипаносому путем рецептор-опосредованного эндоцитоза, а затем локализуется в эндосомах. На примере конъюгата аптамера **2-16** с биотином показана возможность использования таких аптамеров для доставки других соединений внутрь трипаносом [53]. Для повышения устойчивости аптамера **2-16** в биологических средах пиримидиновые нуклеозиды заменили их 2'-амино- или 2'-фтор-аналогами. Аптамер, содержащий 2'-NH₂-группы, в результате модификации полностью утратил способность связываться с трипаносомами, в то время как 2'-F-модифицированный аптамер сохранял к ним сродство ($K_d = 70$ нМ), обладая при этом высокой устойчивостью к нуклеазам сыворотки [54]. Более удачным оказалось использование в ходе селекции модифицированных РНК-библиотек, содержащих 2'-фтор- или 2'-аминопиримидиновые нуклеотиды. При отборе 2'-аминосодержащих РНК-аптамеров в качестве мишени использовали живых трипаносом. Полученный аптамер обладал практически таким же сродством к трипаносомам, как и **2-16** ($K_d = 70$ нМ), и связывался с ними в ограниченной области вокруг жгутика [55]. Для получения 2'-F-содержащих РНК-аптамеров, способных связываться со всей поверхностью трипаносомы ($K_d = 70$ нМ), использовали селекцию на очищенный поверхностный белок sVSG [56, 57].

Получены также 2'-F-РНК-аптамеры к другому виду трипаносом – *Tr. cruzi*, возбудителю болезни Шагаса [58]. На стадии трипомастиготы *Tr. cruzi* связываются с клетками хозяина и проникают в них за счет взаимодействия с внеклеточными матричными белками клеток хозяина. В концентрации

1 мкМ 2'-Ф-пиримидинсодержащие РНК-аптамеры на 50–80% блокировали проникновение паразитов в клетки.

Большой интерес вызывают аптамеры, способные связываться с бактериями различных видов. Так, проведена селекция ДНК-аптамеров к возбудителю туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis* [59]. Однократное введение 0.8 мкг полученного аптамера **NK2** приводило к снижению количества микобактерий у инфицированных туберкулезом мышей, смягчало проявления заболевания и увеличивало продолжительность жизни [59]. Предполагается, что аптамер **NK2** может использоваться в терапии туберкулеза. Получены также аптамеры, способные специфично связываться с поверхностью спор возбудителя сибирской язвы *Bacillus anthracis* [60] и кристаллообразующих бактерий *B. thuringiensis* [61], сальмонелл *Salmonella enterica* [62] и *S. typhi* [63], стафилококка *Staphylococcus aureus* [64], молочнокислых бактерий *Lactobacillus acidophilus* [65], кишечной палочки *Escherichia coli* [66, 67] и бактерий *Campylobacter jejuni* [68].

Отдельно стоит выделить эскорт-аптамеры, способные связываться с «чужими» белками, представленными на поверхности зараженных клеток. А. Varfod и соавт. [69] получили аптамеры к белку PfEMP1, который экспрессируется на поверхности эритроцитов, зараженных малярийным плазмодием *Plasmodium falciparum*. Этот белок способствует слипанию эритроцитов (образование так называемых розеток) и прилипанию зараженных эритроцитов к стенкам мелких сосудов. В качестве мишени для селекции 2'-Ф-пиримидинсодержащих РНК-аптамеров использовали рекомбинантный белок DBL1 α – полуконсервативный N-концевой домен белка PfEMP1, ответственный за образование розеток. Полученные аптамеры в концентрации 387 нМ (12 мкг/мл) вызывали практически полное разрушение розеток в культуре клеток, что позволяет рассматривать их как потенциальные противомаларийные средства.

Методом селекции на рекомбинантный белок получены 2'-Ф-РНК-аптамеры к gp120 – белку оболочки вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1), способные связываться с gp120 на поверхности инфицированных вирусом клеток (см. обзор [7]).

В работе F. Chen и соавт. [70] описано получение ДНК-аптамеров к экспрессированному на поверхности клеток белку E2 – белку оболочки вируса гепатита С. Для контрселекции использовали не экспрессирующие этот белок клетки той же линии. В результате отбора получили серию аптамеров, из которых наибольшим сродством к поверхностному белку обладал аптамер **ZE2** ($K_d = 1$ нМ) (рис. 9).

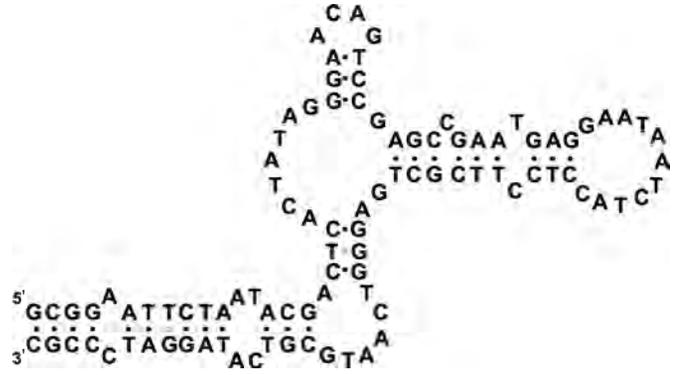


Рис. 9. Предполагаемая вторичная структура ДНК-аптамера **ZE2** к белку оболочки вируса гепатита С [70].

Этот аптамер в концентрации 100 нМ обладал способностью связываться с вирусными частицами и блокировать слияние вирусных частиц с клетками. Эти результаты позволили предположить, что в перспективе аптамер **ZE2** может использоваться как для диагностики гепатита С, так и для лечения больных этим заболеванием, а также при изучении взаимодействия вируса с клетками.

Создание на основе эскорт-аптамеров систем для доставки лекарственных препаратов в клетки, диагностики различных заболеваний и определения патогенных микроорганизмов в окружающей среде и в пищевых продуктах описано в следующем разделе.

ПРИМЕНЕНИЕ ЭСКОРТ-АПТАМЕРОВ

На основе эскорт-аптамеров создано большое количество мультифункциональных конструкций, в которых аптамер выступает в качестве направляющего компонента, обеспечивающего специфическое узнавание клеток или тканей-мишеней. Аптамеры, способные после связывания с поверхностными белками проникать внутрь клеток путем рецепторопосредованного эндоцитоза, могут быть использованы в качестве основы для создания высокоспецифичных лекарственных средств, адресно воздействующих на определенные клетки. Другое активно развивающееся направление применения эскорт-аптамеров – создание на их основе высокоточных диагностических систем, позволяющих детектировать клетки-мишени среди других клеток организма. На рис. 10 схематично изображены основные типы конъюгатов эскорт-аптамеров, применяемых в настоящее время для доставки в клетки лекарственных средств и специфической детекции клеток. Данные по применению эскорт-аптамеров кратко суммированы в табл. 2.

Таблица 2. Эскорт-аптамеры и их использование для доставки различных препаратов в клетки и специфической детекции клеток

Аптамер	Мишень	Способ отбора	Применение
2'-F-РНК	Простат-специфичный мембранный антиген (ПСМА)	Селекция на рекомбинантный белок – внеклеточный домен ПСМА [21]	Доставка в опухолевые клетки LNCaP гелонина [71] и доксорубина [72]. Доставка в клетки LNCaP siRNA [74–77]. Доставка в клетки LNCaP наночастиц, содержащих противоопухолевый препарат доцетаксел [82–84]. Визуализация клеток LNCaP с использованием присоединенных к аптамерам наночастиц золота [92] или люминесцентных кристаллов CdSe и CdTe [90]. Электрохимическая детекция клеток рака предстательной железы с использованием аптамера, иммобилизованного на Au-электроде [91]. Детекция ПСМА на поверхности клеток LNCaP методом лигирования сближенных проб [96]
ДНК	Тирозиновая протеинкиназа 7 (РТК-7)	Селекция на предшественники Т-клеточного острого миелобластного лейкоза CCRF-CEM [26]	Доставка в клетки CCRF-CEM доксорубина [73], Au/Ag-наностержней [80, 81], дендримеров на основе полиамидамина [87]. Исследование распределения рецепторов РТК-7 на клеточной поверхности с использованием конъюгатов аптамеров с флуоресцеином [93]. Обратимое флуоресцентное мечение клеток CCRF-CEM с использованием конъюгатов аптамеров с квантовой точкой Qdot525 [94]
2'-F-РНК	CD4-рецептор крысы	Селекция на рекомбинантный белок [40]	Доставка в клетки siRNA [78]
2'-F-РНК	Белок оболочки ВИЧ-1	Селекция на рекомбинантный белок gp120 [79]	Доставка siRNA в клетки, инфицированные ВИЧ-1 [7, 79]
ДНК	Муцин (MUC1)	Селекция на синтетические пептиды – фрагменты муцина [23, 24]	Фотодинамическая терапия с использованием фотореакционноспособных конъюгатов аптамера с хлорином e6 [24]. Визуализация опухолей с использованием радиоактивных изотопов (⁹⁹ Tc) [88]
ДНК, РНК	Трансферриновый рецептор мыши (TfR)	Селекция на рекомбинантный белок – внеклеточный домен TfR [43]	Доставка в клетки лизосомных ферментов для лечения лизосомных болезней накопления [43]
2'-F-РНК	Тенасцин С	Перекрестная селекция с использованием рекомбинантного белка и клеток U251 [19]	Визуализация опухолей с использованием радиоактивных изотопов (⁹⁹ Tc) [89]
ДНК	Связанная с мембраной тяжелая цепь иммуноглобулина М	Селекция на В-клетки лимфомы Беркитта (Ramos-клетки) [31]	Мицеллы для доставки в клетки различных препаратов [86]. Тест-полоски для обнаружения Ramos-клеток в образцах крови на основе аптамеров TD05 и TE02 [95]
ДНК	Бактерии <i>B. thuringiensis</i>	Селекция на споры <i>B. thuringiensis</i> [61]	Детекция спор <i>B. thuringiensis</i> с использованием конъюгатов аптамеров с квантовыми точками CdSe-ZnS [61]
РНК	Бактерии <i>E. coli</i>	Селекция на штамм <i>E. coli</i> DH5α [67]	Потенциометрическая детекция <i>E. coli</i> с использованием аптамеров, присоединенных к углеродным нанотрубкам [67]. Детекция <i>E. coli</i> методом количественной ОТ-ПЦР РНК-аптамеров, связавшихся с бактериями [98]
РНК	Бактерии <i>S. typhi</i>	Селекция на основной белок микроворсинок <i>S. typhi</i> [63]	Потенциометрическая детекция <i>S. typhi</i> с использованием аптамеров, присоединенных к углеродным нанотрубкам [97]
ДНК	Мезенхимные стволовые клетки	Селекция на свиные мезенхимные стволовые клетки [49]	Выделение стволовых клеток из костного мозга с использованием аптамеров, иммобилизованных на магнитных частицах, сортировка клеток с использованием флуоресцентных конъюгатов аптамеров [49]
ДНК	Предшественники клеток эндотелия свиньи	Селекция на CD31-положительные клетки из крови свиньи [50]	Иммобилизация, рост и дифференциация предшественников эндотелиальных клеток на поверхности дисков с иммобилизованными аптамерами – модели сосудистых имплантатов [50]

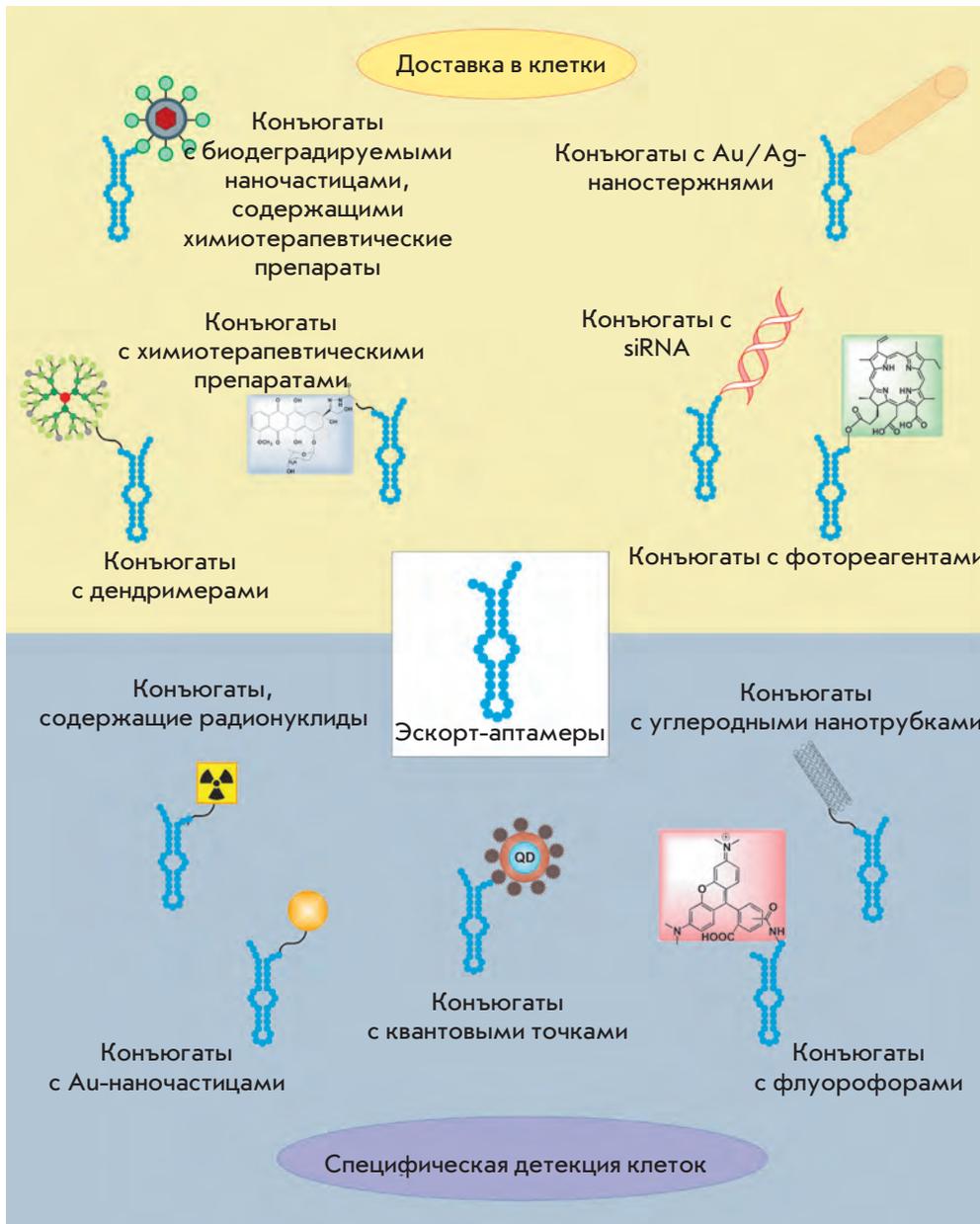


Рис. 10. Основные типы конъюгатов эскорт-аптамеров, используемых для адресной доставки терапевтических препаратов в клетки и для специфической детекции клеток.

Использование эскорт-аптамеров для доставки в клетки различных препаратов

Одни из наиболее популярных кандидатов для создания систем доставки – анти-ПСМА-аптамеры **A9** и **A10**, которые связываются с простатспецифичным мембранным антигеном [20]. Этот белок способен проникать в клетки за счет клатрин-опосредованной интернализации [97], а его гиперэкспрессия характерна для многих опухолей. Сочетание этих факторов обусловило интерес к использованию анти-ПСМА-аптамеров в качестве адресующей части для доставки различных противоопухолевых средств в клетки. Так, конъюгирование анти-ПСМА-аптамера **A9**

с белковым токсином гелонином привело к увеличению цитотоксичности по отношению к клеткам-мишеням примерно в 180 раз по сравнению со свободным гелонином ($IC_{50} = 27$ нМ для конъюгата и 5 мкМ для гелонина) [71]. При этом в случае контрольных клеток, не экспрессирующих белок ПСМА, цитотоксичность конъюгата аптамер-гелонин была ниже, чем у свободного гелонина ($IC_{50} = 15$ мкМ), что говорит о высокой избирательности этого конъюгата. Анти-ПСМА-аптамер **A10** был использован V. Bagalkot и соавт. [72] для доставки в клетки доксорубина. Антрациклиновый антибиотик доксорубин широко применяется при целом спектре заболеваний, таких,

как лейкозы, злокачественные лимфомы, саркомы, рак различной этиологии, однако к числу его недостатков относятся побочные токсические эффекты, в частности кардиотоксичность. Для получения конъюгатов [72] использовали способность доксорубина интеркалировать между парами оснований двухцепочечных нуклеиновых кислот. В результате интеркаляции доксорубина в двухцепочечный участок аптамера **A10** получили нековалентные конъюгаты. Цитотоксичность этих конъюгатов в отношении клеток-мишеней LNCaP была такой же, как у свободного доксорубина в той же концентрации ($IC_{50} = 5 \text{ мкМ}$). На контрольных клетках РС3 цитотоксичность конъюгатов была значительно ниже. Для доставки доксорубина в клетки CCRF-CEM лимфобластного лейкоза человека использовали эскорт-аптамер **sgc8c** («укороченный» вариант аптамера **sgc8**). В работе Y. Huang и соавт. [73] получен конъюгат аптамера **sgc8c** с доксорубином, присоединенным к 5'-концу аптамера кислотолabileм гидразоновой связью, гидролизующейся после проникновения конъюгата в клетку. Показано, что такие конъюгаты способны селективно проникать в клетки CCRF-CEM путем рецептор-опосредованного эндоцитоза и обладают в отношении этих клеток такой же цитотоксичностью, как и свободный доксорубин ($IC_{50} = 0.3 \text{ мкМ}$). При этом для контрольных Ramos-клеток конъюгат аптамера с доксорубином, в отличие от свободного доксорубина, был нетоксичным. Таким образом, присоединение к химиотерапевтическим средствам эскорт-аптамеров позволяет ограничить их токсическое воздействие только опухолевыми клетками. Можно полагать, что на основе таких конъюгатов будут созданы новые средства для химиотерапии опухолей, обладающие минимальными побочными эффектами.

Эскорт-аптамеры использовали также для доставки в клетки малых интерферирующих РНК (siRNA). На основе анти-ПСМА-аптамеров разработано несколько типов конструкций для доставки siRNA. Для доставки siRNA в ПСМА-положительные опухолевые клетки использовали тетрамерный биотин-стрептавидиновый комплекс, в состав которого входили две биотинилированные цепи аптамера **A9** и две биотинилированные молекулы siRNA, направленные на мРНК генов ламина А/С или *GADPH* (рис. 11А) [74]. Такие комплексы проникали в клетки без использования трансфектантов и в концентрации 22.5 нМ подавляли экспрессию генов-мишеней на 50–80% – с той же эффективностью, что и соответствующие siRNA, доставленные в клетки при помощи олигофектамина. Созданы химерные конструкции, которые представляли собой единую нуклеотидную последовательность, содержащую аптамер **A10**

и одну из цепей siRNA с комплементарно присоединенной к ней второй цепью siRNA (рис. 11Б) [75]. Эти конструкции в концентрации 400 нМ способны проникать в ПСМА-положительные клетки без помощи трансфектантов и практически полностью подавляли экспрессию генов-мишеней *bcl2* и *plk1*. С целью оптимизации структуры химерных конструкций адресующий аптамер был укорочен с 71 до 39 нуклеотидов, что упростило химический синтез обоих компонентов конструкции. В структуру siRNA, направленной на мРНК гена *PLK1*, был введен ряд модификаций, повышающих специфичность и эффективность взаимодействия с мРНК-мишенью. К «пассажирской» цепи siRNA был присоединен остаток полиэтиленгликоля с молекулярным весом 20 кДа, что позволило увеличить период полужизни химерных конструкций в крови мышей с 35 мин до 30 ч. Полученный препарат вызывал существенную регрессию ПСМА-положительной опухоли у мышей после введения пяти доз по 0.25 нмоль [76].

Описан еще один вариант химерной конструкции, содержащей две молекулы анти-ПСМА-аптамера **A10-3**: одна из цепей siRNA, направленной на мРНК эукариотического фактора элонгации 2 (eEF2), «встроена» между двумя аптамерными последо-

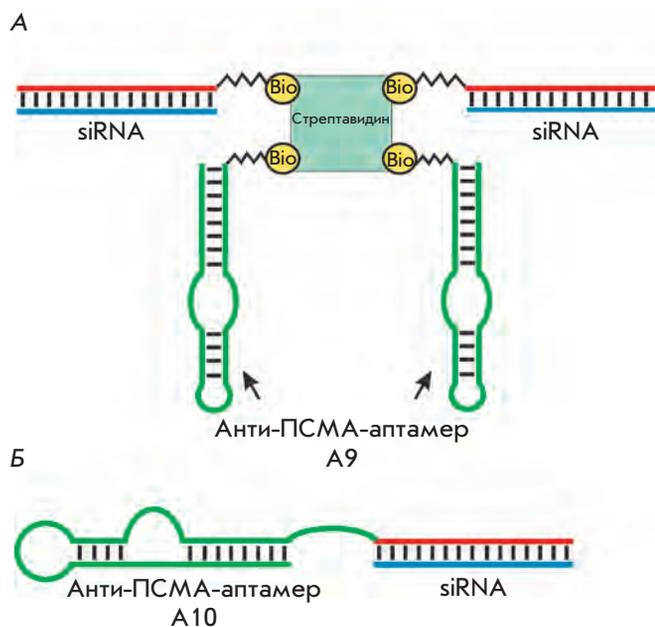


Рис. 11. Схематическое изображение химерных конструкций для доставки siRNA в ПСМА-положительные клетки. А – Конъюгат биотинилированных анти-ПСМА-аптамера и siRNA, соединенных через стрептавидин [74]. Б – Химерная РНК, состоящая из анти-ПСМА-аптамера и siRNA [75]. Bio – остаток биотина.

вательностями, а вторая присоединена к ней комплементарно [77]. Такие конъюгаты в концентрации 2 мкМ на 95% подавляли рост клеток-мишеней, не влияя при этом на рост ПСМА-отрицательных контрольных клеток.

Интересный вариант конструкций, содержащих «адресующий» аптамер и siRNA, описан в работе [78]. Для их создания использована РНК фага φ29, способная образовывать мультимерные комплексы благодаря взаимодействию петель РНК. К каждому из компонентов конструкции – к аптамеру, узнающему рецептор CD4 [40], к siRNA, направленным на мРНК различных факторов апоптоза, и к флуоресцентному красителю – присоединяли фрагмент фаговой РНК. Образующиеся в результате тримеры, содержащие аптамер, siRNA и репортерную группу, были способны проникать в CD4-положительные клетки и ингибировать экспрессию генов-мишеней при концентрации 100 нМ.

Для воздействия на инфицированные ВИЧ-1 клетки использовали химерные конструкции [7, 79], созданные по принципу, предложенному J. McNamara и соавт. [75], и состоящие из 2'-F-РНК-аптамера, узнающего на клеточной поверхности вирусный белок gp120, и siRNA, направленной на РНК *Tat/Rev* ВИЧ-1. Такие конструкции способны ингибировать репликацию ВИЧ-1 в культуре клеток (при концентрации 400 нМ) [79]. Сообщается также об их использовании для подавления репликации вируса в органах мышей [7].

Для фототермического воздействия на лейкозные клетки использовали конъюгаты аптамера **sgc8c** с золото-серебряными наностержнями [80, 81]. При облучении лазером наностержни нагреваются до 50°C, что приводит к гибели клеток от теплового шока. Конъюгаты аптамеров с наностержнями (к одному наностержню было присоединено около 80 молекул аптамера) селективно проникали в клетки-мишени, при этом около 90% клеток погибали после облучения [81].

На основе аптамеров, способных связываться с поверхностным белком муцином, созданы реакционноспособные соединения для фотодинамической терапии – ковалентные конъюгаты аптамеров с хлорином e6 [24]. Такие конъюгаты селективно проникали в опухолевые клетки, экспрессирующие муцин, и после облучения вызывали их гибель с эффективностью в 500 раз большей, чем у свободного хлорина. При этом для здоровых клеток конъюгаты были нетоксичными.

ДНК-аптамер к трансферриному рецептору мышцы использовали для доставки в клетки лизосомного фермента α-L-идуронидазы [43]. Показано, что конъюгаты аптамер-фермент проникают в фи-

бробласты мышцы с дефицитом этого фермента, а затем попадают в лизосомы, где введенный фермент способен функционировать, восстанавливая метаболизм клетки. Полученные результаты позволяют рассматривать конъюгаты аптамеров к трансферриновому рецептору с лизосомными ферментами как перспективные препараты для коррекции заболеваний, связанных с нарушением функций лизосом.

Для специфичной доставки терапевтических средств используют также различного рода носители, присоединенные к адресующим аптамерам. Так, к молекуле анти-ПСМА-аптамера **A10** ковалентно присоединяли наночастицы, состоящие из сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA), с инкапсулированным в них доцетакселом [82–84]. Полученные конъюгаты специфически связывались с клетками LNCaP, экспрессирующими белок ПСМА, и проникали в них [82, 85]. На мышах с привитым раком предстательной железы было показано, что конъюгаты анти-ПСМА-аптамеров с наночастицами на основе PLGA, содержащими доцетаксел, эффективно подавляют рост опухолей и даже приводят к полной ремиссии [83].

Описано создание мицелл на основе аптамера **TD05** с присоединенным остатком стеариновой кислоты [86]. Такие мицеллы обладали повышенным по сравнению с индивидуальным аптамером **TD05** сродством к клеткам-мишеням и специфично проникали в клетки; в дальнейшем планируется использовать их для доставки в клетки лекарственных средств.

В качестве носителя лекарственных средств в работе J. Zhou и соавт. [87] предложено использовать полиамидаминовые (РАМАМ) дендримеры. Созданные конъюгаты аптамера **sgc8c** с дендримерами были способны селективно и эффективно связываться с клетками CCRF-CEM и проникать в них. Размер конъюгата аптамер-дендример составляет около 8 нм и является оптимальным для использования таких конъюгатов в качестве основы для терапевтических средств.

Таким образом, использование аптамеров для адресной доставки наночастиц с противоопухолевыми средствами в опухолевые ткани представляется перспективным направлением в разработке новых стратегий терапии опухолей.

Использование эскорт-аптамеров для специфической детекции клеток

Способность эскорт-аптамеров селективно узнавать клетки определенного типа позволяет создавать на их основе высокоспецифичные системы детекции. Введение в состав аптамеров меток различной природы позволяет использовать их для детекции клеток в культурах, в биологических образцах,

а также непосредственно в живых многоклеточных организмах. Так, аптамеры, содержащие радиоактивные метки, использовали для визуализации опухолей у мышей. Конъюгаты антитенасцинового аптамера **ТТА1** и антимуциновых аптамеров с хелатирующими агентами, способными связывать ^{99}Tc , использовали для визуализации привитых мышам ксенотрансплантатов глиобластомы и рака молочной железы [88, 89].

Разнообразные системы детекции клеток рака предстательной железы созданы на основе анти-ПСМА-аптамеров. В работе Т. Chu и соавт. [90] для визуализации ПСМА-положительных клеток получены конъюгаты анти-ПСМА-аптамера **A9** с люминесцентными кристаллами CdSe и CdTe (так называемыми квантовыми точками). Эти конъюгаты эффективно и специфично связывались с клетками LNCaP, распределенными в модельной ткани – трехмерном коллагеновом матриксе. Для электрохимической детекции двух типов клеток рака предстательной железы – содержащих на поверхности ПСМА (ПСМА(+)) и не содержащих этого белка (ПСМА(-)), использованы иммобилизованные на золотом электроде «двойные» конструкции, состоящие из анти-ПСМА-РНК-аптамера **A10** и пептидного аптамера к ПСМА(-)-клеткам [91]. В работе D. Javier и соавт. [92] для визуализации ПСМА-положительных клеток в состав анти-ПСМА-аптамеров вводили дополнительные олигонуклеотидные фрагменты, комплементарные 24-звенным олигонуклеотидам, ковалентно присоединенным к наночастицам золота. Методом детекции отраженного света с использованием конфокального микроскопа наблюдали связывание таких комплексов с ПСМА на клеточной поверхности.

Конъюгаты ДНК-аптамера **sgc8** с флуоресцеином использовали для изучения распределения рецепторов РТК-7 на клеточной поверхности методом флуоресцентной корреляционной микроскопии [93]. Предложен новый способ обратимого флуоресцентного мечения живых клеток, продемонстрированный на примере клеток CCRF-CEM [94]. Конъюгаты аптамера **sgc8** с квантовой точкой Qdot525 селективно связывались с клетками, а после обработки ДНК-азой наблюдалось полное удаление конъюгатов с клеточной поверхности, при этом клетки оставались жизнеспособными. Перспективным применением этого метода является флуоресцентная сортировка, позволяющая быстро и эффективно выделять клетки нужного типа. Флуоресцентная сортировка стволовых клеток с использованием флуоресцеиновых конъюгатов аптамеров описана также в работе К. Guo и соавт. [49].

Аптамеры **TD05** и **TE02** к Ramos-клеткам лимфомы применили [95] при создании биосенсоров в виде

тест-полосок для быстрого определения циркулирующих в крови злокачественных клеток. Тест-зона биосенсора содержит конъюгаты аптамера **TD05** с золотыми наночастицами. Эти конъюгаты образуют с Ramos-клетками окрашенные комплексы, которые затем мигрируют по полоске и удерживаются в индикаторной зоне биосенсора благодаря связыванию Ramos-клеток с иммобилизованным аптамером **TE02**. В результате образуется характерная полоса красного цвета. Такие биосенсоры могут использоваться для обнаружения клеток непосредственно в образцах крови с возможностью визуальной качественной оценки или количественного определения при помощи портативного сканера.

Для обнаружения ПСМА-белка на поверхности клеток предложено использовать так называемый метод лигирования сблизженных проб (см. рис. 12) [96]. Система состоит из аптамеров **A9**, содержащих на 3'- или 5'-конце дополнительные олигонуклеотидные фрагменты, а также комплементарные этим фрагментам ДНК-пробы и «скрепляющий» олигодезоксирибонуклеотид, частично комплементарный каждой из ДНК-проб. Поскольку ПСМА представляет собой димер, при связывании аптамеров с ПСМА на клеточной поверхности ДНК-пробы располагаются достаточно близко для соединения их «скрепляющим» олигомером через образование комплементарного комплекса. Затем происходит лигирование ДНК-проб в этом комплексе, а для детекции образовавшейся дцДНК используют ПЦР в режиме реального времени. Этот метод очень чувствителен и позволяет обнаруживать 10 клеток LNCaP (рак предстательной железы) в присутствии 10^5 клеток HeLa, которые не содержат на поверхности белок ПСМА.

Недавно было предложено использовать аптамеры, связывающиеся с бактериями, при создании биосенсоров для детекции патогенных микроорганизмов. ДНК-аптамеры с присоединенными к ним квантовыми точками CdSe-ZnS использовали для флуоресцентной детекции *B. thuringiensis* [61]. На основе РНК-аптамеров, иммобилизованных на поверхности одностенных углеродных нанотрубок, созданы потенциометрические биосенсоры для определения *E. coli* [67] и *S. typhi* [97] и показана возможность их использования для селективной детекции этих бактерий. Разработан метод детекции *E. coli*, основанный на количественной ОТ-ПЦР РНК-аптамеров, связавшихся с бактериями, иммобилизованными на магнитных частицах [98]. Новые биосенсоры на основе аптамеров могут найти применение для высокочувствительного определения бактерий в пищевых продуктах и окружающей среде, а также в диагностике инфекционных заболеваний.

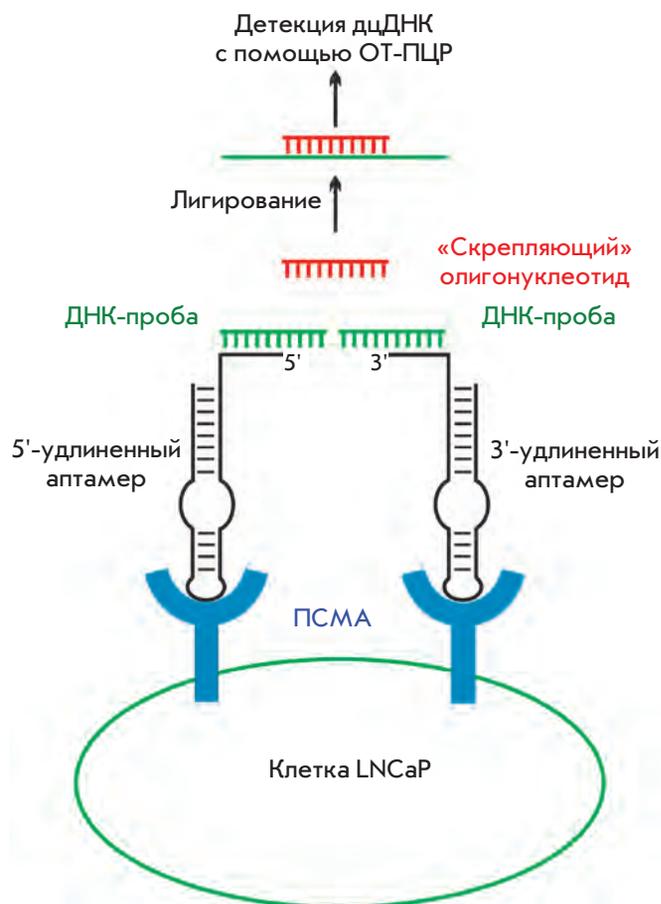


Рис. 12. Детекция ПСМА на поверхности клеток с использованием анти-ПСМА-аптамеров методом лигирования сближенных проб [96]. Метод включает следующие стадии: 1) – формирование компонентных комплексов аптамеров с ДНК-пробами; 2) – связывание аптамеров с ПСМА на клеточной поверхности, в результате которого происходит сближение двух ДНК-проб; 3) – гибридизация обеих ДНК-проб со «скрепляющим» олигонуклеотидом; 4) – лигирование ДНК-проб в образовавшемся комплексе; 5) – детекция полученной дцДНК методом ПЦР в реальном времени.

Отдельно следует выделить еще одну многообещающую область применения эскорт-аптамеров – селективное выделение клеток или их иммобилизацию. Так, присоединение к магнитным частицам аптаме-

ров, связывающихся со стволовыми клетками свиньи, позволило создать систему селективного выделения стволовых клеток из костного мозга [49]. В работе [50] ДНК-аптамеры, способные связываться с предшественниками эндотелиальных клеток свиньи, были иммобилизованы на поверхности дисков из политетрафторэтилена или полидиметилсилоксана. Оказалось, что с использованием таких покрытых аптамерами дисков можно селективно выделить из крови предшественники эндотелиальных клеток, которые затем, оставаясь связанными с дисками, дифференцируются в клетки сосудистого эндотелия. Предполагается, что в дальнейшем этот подход можно будет использовать для эпителизации сосудистых имплантатов, снижая тем самым риск их отторжения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в настоящее время создан ряд эскорт-аптамеров, способных специфично и эффективно связываться с клетками определенного типа, разработаны подходы к повышению устойчивости эскорт-аптамеров в биологических средах. Показано, что на основе эскорт-аптамеров могут быть созданы эффективные и высокоспецифичные системы доставки терапевтических средств в клетки, детекции клеток определенного типа, сортировки клеток, избирательного блокирования поверхностных белков. С каждым годом появляется все больше работ, посвященных отбору и применению эскорт-аптамеров к самым различным клеточным мишеням, от бактерий до стволовых клеток. Необходимо отметить, что селекция аптамеров на живые клетки до сих пор остается более трудоемким и «тонким» процессом, чем отбор аптамеров к индивидуальным соединениям, однако растущий интерес к этому направлению и совершенствование методов селекции позволяют надеяться на появление в ближайшем будущем еще большего разнообразия эскорт-аптамеров, а также терапевтических и диагностических агентов на их основе. ●

Обзор подготовлен при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 11-04-01014-а), а также гранта Правительства Новосибирской области для молодых ученых 2011 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ellington A.D., Szostak J.W. // Nature. 1990. V. 346. P. 818–822.
2. Tuerk C., Gold L. // Science. 1990. V. 249. P. 505–510.
3. Robertson D.L., Joyce G.F. // Nature. 1990. V. 344. P. 467–468.
4. Mayer G. // Angew. Chem. Int. Ed. 2009. V. 48. P. 2672–2689.

5. Stoltenburg R., Reinemann C., Strehlitz B. // Biomol. Eng. 2007. V. 24. P. 381–403.
6. Shamah S.M., Healy J.M., Cload S.T. // Acc. Chem. Res. 2008. V. 41. P. 130–138.
7. Zhou J., Rossi J.J. // Oligonucleotides. 2011. V. 21. P. 1–10.
8. Syed M.A., Pervaiz S. // Oligonucleotides. 2010. V. 20. P. 215–224.

9. Chapman J.A., Beckey C. // *Ann. Pharmacother.* 2006. V. 40. P. 1322–1326.
10. Ng E.W., Shima D.T., Calias P., Cunningham E.T., Guyer D.R., Adamis A.P. // *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2006. V. 5. P. 123–132.
11. Hicke B.J., Stephens A.W. // *J. Clin. Invest.* 2000. V. 106. P. 923–928.
12. Breaker R.R. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1997. V. 1. P. 26–31.
13. Fitzwater T., Polisky B. // *Meth. Enzymol.* 1996. V. 267. P. 275–301.
14. Sousa R. // *Meth. Enzymol.* 2000. V. 317. P. 65–74.
15. Chelliserrykattil J., Ellington A.D. // *Nat. Biotechnol.* 2004. V. 22. P. 1155–1160.
16. Burmeister P.E., Lewis S.D., Silva R.F., Preiss J.R., Horwitz L.R., Pendergrast P.S., McCauley T.G., Kurz J.C., Epstein D.M., Wilson C., et al. // *Chem. Biol.* 2005. V. 12. P. 25–33.
17. Schmidt K.S., Borkowski S., Kurreck J., Stephens A.W., Bald R., Hecht M., Friebe M., Dinkelborg L., Erdmann V.A. // *Nucl. Acids Res.* 2004. V. 32. P. 5757–5765.
18. Shangguan D., Tang Z., Mallikaratchy P., Xiao Z., Tan W. // *ChemBiochem.* 2007. V. 8. P. 603–606.
19. Hicke B.J., Marion C., Chang Y.F., Gould T., Lynott C.K., Parma D., Schmidt P.G., Warren S. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 48644–48654.
20. Morris K.N., Jensen K.B., Julin C.M., Weil M., Gold L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. P. 2902–2907.
21. Lupold S.E., Hicke B.J., Lin Y., Coffey D.S. // *Cancer Res.* 2002. V. 62. P. 4029–4033.
22. Ferreira C., Papamichael K., Guilbault G., Schwarzacher T., Garipey J., Missailidis S. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2008. V. 390. P. 1039–1050.
23. Ferreira C.S., Matthews C.S., Missailidis S. // *Tumour Biol.* 2006. V. 27. P. 289–301.
24. Ferreira C.S., Cheung M.C., Missailidis S., Bisland S., Garipey J. // *Nucl. Acids Res.* 2009. V. 37. P. 866–876.
25. Daniels D.A., Chen H., Hicke B.J., Swiderek K.M., Gold L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. P. 15416–15421.
26. Shangguan D., Li Y., Tang Z., Cao Z.C., Chen H.W., Mallikaratchy P., Sefah K., Yang C.J., Tan W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. P. 11838–11843.
27. Shangguan D., Cao Z.C., Li Y., Tan W. // *Clin. Chem.* 2007. V. 53. P. 1153–1155.
28. Shangguan D., Cao Z., Meng L., Mallikaratchy P., Sefah K., Wang H., Li Y., Tan W. // *J. Proteome Res.* 2008. V. 7. P. 2133–2139.
29. Xiao Z., Shangguan D., Cao Z., Fang X., Tan W. // *Chemistry.* 2008. V. 14. P. 1769–1775.
30. Li N., Ebright J.N., Stovall G.M., Chen X., Nguyen H.H., Singh A., Syrett A., Ellington A.D. // *J. Proteome Res.* 2009. V. 8. P. 2438–2448.
31. Tang Z., Shangguan D., Wang K., Shi H., Sefah K., Mallikaratchy P., Chen H.W., Li Y., Tan W. // *Anal. Chem.* 2007. V. 79. P. 4900–4907.
32. Mallikaratchy P., Tang Z., Kwame S., Meng L., Shangguan D., Tan W. // *Mol. Cell. Proteom.* 2007. V. 6. P. 2230–2238.
33. Mallikaratchy P.R., Ruggiero A., Gardner J.R., Kuryavyi V., Maguire W.F., Heaney M.L., McDevitt M.R., Patel D.J., Scheinberg D.A. // *Nucl. Acids Res.* 2011. V. 39. P. 2458–2469.
34. Sefah K., Tang Z.W., Shangguan D.H., Chen H., Lopez-Colon D., Li Y., Parekh P., Martin J., Meng L., Phillips J.A., et al. // *Leukemia.* 2009. V. 23. P. 235–244.
35. Chen H.W., Medley C.D., Sefah K., Shangguan D., Tang Z., Meng L., Smith J.E., Tan W. // *ChemMedChem.* 2008. V. 3. P. 991–1001.
36. Shangguan D., Meng L., Cao Z.C., Xiao Z., Fang X., Li Y., Cardona D., Witek R.P., Liu C., Tan W. // *Anal. Chem.* 2008. V. 80. P. 721–728.
37. Blank M., Weinschenk T., Priemer M., Schluesener H. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 16464–16468.
38. Zueva E., Rubio L.I., Ducongé F., Tavitian B. // *Int. J. Cancer.* 2011. V. 128. P. 797–804.
39. Mi J., Liu Y., Rabbani Z.N., Yang Z., Urban J.H., Sullenger B.A., Clary B.M. // *Nat. Chem. Biol.* 2010. V. 6. P. 22–24.
40. Kraus E., James W., Barclay A.N. // *J. Immunol.* 1998. V. 160. P. 5209–5212.
41. Davis K.A., Lin Y., Abrams B., Jayasena S.D. // *Nucl. Acids Res.* 1998. V. 26. P. 3915–3924.
42. Santuli-Marotto S., Nair S.K., Rusconi C., Sullenger B., Gilboa E. // *Cancer Res.* 2003. V. 63. P. 7483–7489.
43. Chen C.-H.B., Dellamaggiore K.R., Ouellette C.P., Sedano C.D., Lizardjohry M., Chernis G.A., Gonzales M., Baltasar F.E., Fan A.L., Myerowitz R., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. P. 15908–15913.
44. Ohuchi S.P., Ohtsu T., Nakamura Y. // *Biochimie.* 2006. V. 88. P. 897–904.
45. Cerchia L., Duconge F., Pestourie C., Boulay J., Aissouni Y., Gombert K., Tavitian B., de Francis V., Libri D. // *PLoS Biol.* 2005. V. 3. e123.
46. Pestourie C., Cerchia L., Gombert K., Aissouni Y., Boulay J., De Francis V., Libri D., Tavitian B., Duconge F. // *Oligonucleotides.* 2006. V. 16. P. 323–335.
47. Wang C., Zhang M., Yang G., Zhang D., Ding H., Wang H., Fan M., Shen B., Shao N. // *J. Biotechnol.* 2003. V. 102. P. 15–22.
48. Guo K., Wendel H.P., Scheideler L., Ziemer G., Scheule A.M. // *J. Cell Mol. Med.* 2005. V. 9. P. 731–736.
49. Guo K.T., Schafer R., Paul A., Gerber A., Ziemer G., Wendel H.P. // *Stem Cells.* 2006. V. 24. P. 2220–2231.
50. Hoffmann J., Paul A., Harwardt M., Groll J., Reeswinkel T., Klee D., Moeller M., Fischer H., Walker T., Greiner T., et al. // *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2008. V. 84A. P. 614–621.
51. Berezovski M.V., Lechmann M., Musheev M.U., Mak T.W., Krylov S.N. // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. V. 130. P. 9137–9143.
52. Homann M., Göringer H.U. // *Nucl. Acids Res.* 1999. V. 27. P. 2006–2014.
53. Homann M., Göringer H.U. // *Bioorg. Med. Chem.* 2001. V. 9. P. 2571–2580.
54. Göringer H.U., Homann M., Zacharias M., Adler A. // *Handb. Exp. Pharmacol.* 2006. V. 173. P. 375–393.
55. Homann M., Lörger M., Engstler M., Zacharias M., Göringer H. // *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 2008. V. 9. P. 491–499.
56. Göringer H.U., Homann M., Lörger M. // *Int. J. Parasitol.* 2003. V. 33. P. 1309–1317.
57. Lörger M., Engstler M., Homann M., Göringer H.U. // *Eukaryot. Cell.* 2003. V. 2. P. 84–94.
58. Ulrich H., Magdesian M.H., Alves M.J., Colli W. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 20756–20762.
59. Chen F., Zhou J., Luo F., Mohammed A.B., Zhang X.L. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. V. 357. P. 743–748.
60. Torres-Chavolla E., Alocilja E.C. // *Biosens. Bioelectron.* 2009. V. 24. P. 3175–3182.
61. Ikanovic M., Rudzinski W., Bruno J., Allman A., Carrillo M., Dwarakanath S., Bhaadigadi S., Rao P., Kiel J., Andrews C. // *J. Fluoresc.* 2007. V. 17. P. 193–199.
62. Joshi R., Janagama H., Dwivedi H.P., Senthil Kumar T.M.A., Jaykus L.-A., Scheffers J., Sreevatsan S. // *Mol. Cell. Probes.* 2009. V. 23. P. 20–28.
63. Pan Q., Zhang X.-L., Wu H.-Y., He P.-W., Wang F., Zhang M.-S., Hu J.-M., Xia B., Wu J. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005. V. 49. P. 4052–4060.
64. Cao X., Li S., Chen L., Ding H., Xu H., Huang Y., Li J., Liu N.,

- Cao W., Zhu Y., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2009. V. 37. P. 4621–4628.
65. Hamula C.L.A., Zhang H., Guan L.L., Li X.-F., Le X.C. // *Anal. Chem.* 2008. V. 80. P. 7812–7819.
66. Bruno J., Carrillo M., Phillips T., Andrews C. // *J. Fluoresc.* 2010. V. 20. P. 1211–1223.
67. So H.-M., Park D.-W., Jeon E.-K., Kim Y.-H., Kim B.S., Lee C.-K., Choi S.Y., Kim S.C., Chang H., Lee J.-O. // *Small.* 2008. V. 4. P. 197–201.
68. Dwivedi H., Smiley R., Jaykus L.-A. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010. V. 87. P. 2323–2334.
69. Barfod A., Persson T., Lindh J. // *Parasitol. Res.* 2009. V. 105. P. 1557–1566.
70. Chen F., Hu Y., Li D., Chen H., Zhang X.-L. // *PLoS One.* 2009. V. 4. P. e8142.
71. Chu T.C., Marks J.W., 3rd, Lavery L.A., Faulkner S., Rosenblum M.G., Ellington A.D., Levy M. // *Cancer Res.* 2006. V. 66. P. 5989–5992.
72. Bagalkot V., Farokhzad O.C., Langer R., Jon S. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2006. V. 45. P. 8149–8152.
73. Huang Y.F., Shangguan D., Liu H., Phillips J.A., Zhang X., Chen Y., Tan W. // *ChemBiochem.* 2009. V. 10. P. 862–868.
74. Chu T.C., Twu K.Y., Ellington A.D., Levy M. // *Nucl. Acids Res.* 2006. V. 34. P. e73.
75. McNamara J.O., Andrechek E.R., Wang Y., Viles K.D., Rempel R.E., Gilboa E., Sullenger B.A., Giangrande P.H. // *Nat. Biotechnol.* 2006. V. 24. P. 1005–1015.
76. Dassie J.P., Liu X.-Y., Thomas G.S., Whitaker R.M., Thiel K.W., Stockdale K.R., Meyerholz D.K., McCaffrey A.P., McNamara J.O., Giangrande P.H. // *Nat. Biotechnol.* 2009. V. 27. P. 839–846.
77. Wullner U., Neef I., Eller A., Kleines M., Tur M.K., Barth S. // *Curr. Cancer Drug Targets.* 2008. V. 8. P. 554–565.
78. Khaled A., Guo S., Li F., Guo P. // *Nano Lett.* 2005. V. 5. P. 1797–1808.
79. Zhou J., Swiderski P., Li H., Zhang J., Neff C.P., Akkina R., Rossi J.J. // *Nucl. Acids Res.* 2009. V. 37. P. 3094–3109.
80. Huang Y.F., Chang H.T., Tan W. // *Anal. Chem.* 2008. V. 80. P. 567–572.
81. Huang Y.F., Sefah K., Bamrungsap S., Chang H.T., Tan W. // *Langmuir.* 2008. V. 24. P. 11860–11865.
82. Farokhzad O.C., Jon S., Khademhosseini A., Tran T.N., Lavan D.A., Langer R. // *Cancer Res.* 2004. V. 64. P. 7668–7672.
83. Farokhzad O.C., Cheng J., Teply B.A., Sherifi I., Jon S., Kantoff P.W., Richie J.P., Langer R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. P. 6315–6320.
84. Cheng J., Teply B., Sherifi I., Sung J., Luther G., Gu F.X., Levy-Nissenbaum E., Radovic-Moreno A.F., Langer R., Farokhzad O.C. // *Biomaterials.* 2007. V. 28. P. 869–876.
85. Farokhzad O.C., Khademhosseini A., Jon S., Hermmann A., Cheng J., Chin C., Kiselyuk A., Teply B., Eng G., Langer R. // *Anal. Chem.* 2005. V. 77. P. 5453–5459.
86. Wu Y., Sefah K., Liu H., Wang R., Tan W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. P. 5–10.
87. Zhou J., Soontornworajit B., Martin J., Sullenger B.A., Gilboa E., Wang Y. // *Macromol. Biosci.* 2009. V. 9. P. 831–835.
88. Perkins A.C., Missailidis S. // *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2007. V. 51. P. 292–296.
89. Hicke B.J., Stephens A.W., Gould T., Chang Y.-F., Lynott C.K., Heil J., Borkowski S., Hilger C.-S., Cook G., Warren S., et al. // *J. Nucl. Med.* 2006. V. 47. P. 668–678.
90. Chu T.C., Shieh F., Lavery L.A., Levy M., Richards-Kortum R., Korgel B.A., Ellington A.D. // *Biosens. Bioelectron.* 2006. V. 21. P. 1859–1866.
91. Min K., Song K.-M., Cho M., Chun Y.-S., Shim Y.-B., Ku J. K., Ban C. // *Chem. Commun.* 2010. V. 46. P. 5566–5568.
92. Javier D.J., Nitin N., Levy M., Ellington A., Richards-Kortum R. // *Bioconjugate Chem.* 2008. V. 19. P. 1309–1312.
93. Chen Y., Munteanu A.C., Huang Y.-F., Phillips J., Zhu Z., Mavros M., Tan W. // *Chem. Eur. J.* 2009. V. 15. P. 5327–5336.
94. Terazono H., Anzai Y., Soloviev M., Yasuda K. // *J. Nanobiotechnol.* 2010. V. 8. P. 8.
95. Liu G., Mao X., Phillips J.A., Xu H., Tan W., Zeng L. // *Anal. Chem.* 2009. V. 81. P. 10013–10018.
96. Pai S.S., Ellington A.D. // *Meth. Mol. Biol.* 2009. V. 504. P. 385–398.
97. Zelada-Guillén G.A., Jordi R., Düzgün A., Rius F.X. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009. V. 48. P. 7334–7337.
98. Lee H.-J., Kim B.C., Kim K.-W., Kim Y.K., Kim J., Oh M.-K. // *Biosens. Bioelectron.* 2009. V. 24. P. 3550–3555.

УДК 576.3/.7; 577.017.22

Мезенхимальные стволовые клетки в процессах роста и репарации тканей

Н. И. Калинина*, В. Ю. Сысоева, К. А. Рубина, Е. В. Парфенова, В. А. Ткачук

Факультет фундаментальной медицины, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119192, Москва, Ломоносовский просп., 31, корп. 5

*E-mail: n_i_kalinina@mail.ru

Поступила в редакцию 14.07.2011 г.

РЕФЕРАТ В последние десятилетия появились доказательства того, что физиологическое обновление и регенерация тканей в течение всей жизни животного и человека происходят благодаря стволовым клеткам. Важнейшей популяцией стволовых клеток взрослого организма являются мезенхимальные стволовые клетки (МСК). Впервые эти клетки были обнаружены и выделены из стромы костного мозга. Считалось, что МСК костного мозга служат источником для обновления и восстановления таких соединительных тканей, как костная, хрящевая и жировая. В настоящий момент аналоги МСК костного мозга обнаружены и во всех других тканях. Благодаря подходам, позволяющим идентифицировать МСК *in situ*, выделять их из тканей и наконец оценивать биологические свойства, появилась возможность пересмотреть роль МСК в различных органах и тканях. В настоящем обзоре суммированы собственные и опубликованные данные о роли МСК в процессах репарации и регенерации тканей. По нашим представлениям, МСК выполняют функцию сопряжения кровеносной, иммунной, гормональной и нервной систем с тканеспецифичными стволовыми клетками.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА мезенхимальные стволовые клетки, регенерация тканей, дифференцировка, клеточная терапия.

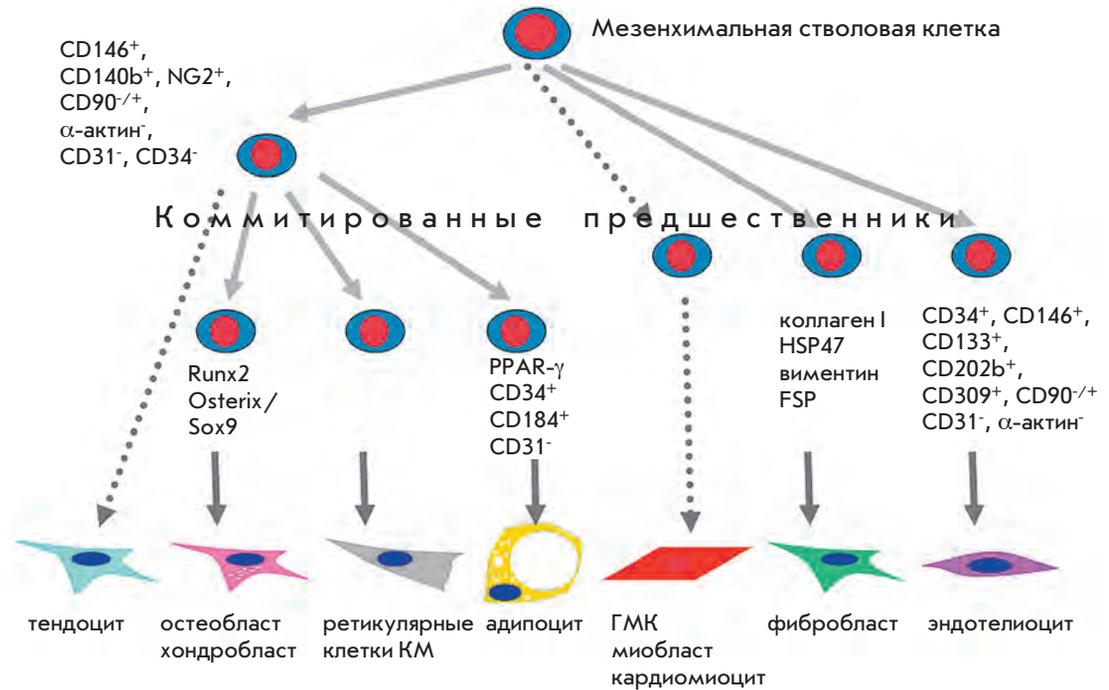
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ГСК – гемопоэтические стволовые клетки; МСК – мезенхимальные стволовые клетки; ММСК – мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки; ТСК – тканеспецифичные стволовые клетки.

Концепция возобновления тканей за счет самоподдерживаемого пула стволовых клеток была впервые сформулирована более 100 лет назад при изучении кроветворения [1]. Однако существование гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), дающих начало всем клеткам крови, получило экспериментальное подтверждение только в середине XX века [2]. До этого времени считалось, что восполнение клеточного состава тканей постнатального организма обусловлено делением специализированных (дифференцированных) клеток. Обновление за счет активности стволовых клеток рассматривалось как механизм, присущий исключительно клеткам крови – уникальной, быстро обновляющейся ткани, содержащей множество функционально гетерогенных типов клеток. В настоящий момент доказано, что поддержание и возобновление клеточного состава практически всех тканей организма человека, включая эпителий кожи и кишечника, печень, скелетные мышцы и миокард, происходят благодаря пролиферации и дифференцировке соответствующих тканеспецифичных стволовых клеток (ТСК). Однако наряду с ТСК в тканях млекопитающих обнаружены и другие стволовые клетки, названные мезенхимальными (МСК).

Первые данные, свидетельствующие о присутствии в костном мозге не только гемопоэтических клеток, но и еще одной популяции постнатальных стволовых клеток, были получены с помощью нескольких подходов. Во-первых, в экспериментальных моделях при интраперитонеальной трансплантации культивированной на носителе стромы костного мозга возникали очаги остеогенеза [3]. Во-вторых, из костного мозга была выделена популяция клеток, отличных от ГСК, но обладающих свойствами стволовых. Эти клетки образовывали клоны (колонии фибробластов) при культивировании [4], сохраняя способность к дифференцировке в нескольких направлениях (в остеобласты, адипоциты и хондроциты) [5].

По аналогии с ГСК предполагалось, что во главе мезенхимальной иерархии стоит МСК костного мозга (модель «мезенгиума») [6, 7] (рис. 1). Было высказано предположение о том, что в течение жизни потомки этой клетки проходят через дискретные стадии дифференцировки, давая начало различным клеткам соединительных тканей, а именно костной и жировой ткани, сухожилиям, хрящам и гладким мышцам [8]. Позднее клетки, совпадающие с МСК костного мозга по своим фенотипическим характеристикам

Рис. 1. Модель мезенхимальной иерархии. Гипотетическая схема, согласно которой МСК проходят через дискретные стадии дифференцировки, давая начало разным клеткам соединительных тканей в течение всей жизни организма.



и дифференцировочному потенциалу, выделены практически из всех эмбриональных и постнатальных тканей млекопитающих, птиц и амфибий [9, 10]. На основании этих наблюдений возникла теория о том, что костный мозг служит депо постнатальных стволовых клеток как гемопоэтических, так и мезенхимальных. Однако предположение о том, что восстановление соединительных тканей всего организма определяется активностью МСК костного мозга, не получило твердых доказательств до сих пор [11].

КУЛЬТИВИРУЕМЫЕ МУЛЬТИПОТЕНТНЫЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ

Идентифицировать МСК и анализировать их непосредственно в тканях очень сложно, поэтому большинство выводов о биологических свойствах этих клеток сделано на основании изучения выделенных из различных тканей популяций стромальных клеток, способных прикрепляться к культуральному пластику и дифференцироваться *in vitro* в остео-, адипо- и хондрогенном направлениях [12]. Несмотря на то что по способности к самообновлению и дифференцировке в различных направлениях такие клетки представляют собой весьма гетерогенную популяцию [13], их также называли МСК. Для того чтобы отличить такие культивируемые клетки от МСК *in situ*, Международное общество клеточной терапии (ISCT, Ванкувер, Канада) предложило использовать термин «мультипотентная мезенхимальная стромальная клетка» (ММСК). Согласно выработанным ISCT минимальным критериям, ММСК должны прикре-

пляться к пластику при культивировании в стандартных условиях; экспрессировать на поверхности маркерные антигены CD105, CD73 и CD90, но при этом не содержать CD45, CD34, CD14 или CD11b, CD79α или CD19 и HLA-DR, а также дифференцироваться в остеобласты, адипоциты и хондробласты *in vitro* [14].

Наиболее перспективными источниками ММСК для изучения их биологических свойств и применения в регенеративной медицине в настоящий момент считаются костный мозг и жировая ткань. Однако эти клетки могут быть выделены и из других тканей, включая кожу, тимус, селезенку и эндометрий [15]. Необходимо учитывать, что ММСК, полученные из различных постнатальных и эмбриональных тканей, даже при культивировании в одних и тех же условиях отличаются друг от друга по способности формировать колонии, экспрессии генов и дифференцировочному потенциалу [9, 15–18]. Эти различия вызывают вопросы о том, насколько клетки, выделенные по их способности прикрепляться к культуральному пластику и расти в стандартных условиях культивирования, биологически эквивалентны друг другу, и являются ли наблюдаемые различия следствием различных биологических функций МСК в соответствующих тканях [12]?

МУЛЬТИПОТЕНТНОСТЬ ММСК

Помимо способности дифференцироваться в остеобласты, хондробласты и адипоциты *in vitro* [7], ММСК дают начало кости или хрящу после эктопической

трансплантации *in vivo* на животных моделях [3], а также опосредуют регенерацию костной ткани после травм [11] и при генетических дефектах остеогенеза (*osteogenesis imperfecta*) [19]. Более того, многие исследования показали, что ММСК также способны дифференцироваться во многие другие типы клеток мезодермального, эктодермального и энтодермального происхождения, включая эндотелиальные клетки [20], кардиомиоциты [21], гепатоциты [22] и нейральные клетки [23]. Однако некоторые авторы, признавая способность ММСК дифференцироваться в трех основных направлениях мезенхимальной дифференцировки – в остеобласты, хондробласты и адипоциты, ставят под сомнение способность ММСК дифференцироваться в клетки других зародышевых листков (энтодермального и эктодермального) как *in vitro*, так и *in vivo* [12]. Так, показано, что ММСК костного мозга после трансплантации способны встраиваться в ткани реципиента скорее за счет слияния с резидентными клетками [24], чем путем дифференцировки в клетки, характерные для данной ткани.

Различия в оценке дифференцировочного потенциала культивируемых ММСК могут объясняться неодинаковым количественным и качественным составом прогениторных клеток в тканях, из которых они были получены. Во-первых, выделенная популяция МСК гетерогенна и содержит по морфологии различные клетки, отличающиеся пролиферативными и дифференцировочными способностями *in vitro* и *in vivo* [25, 26]. Кроме того, мультипотентность ММСК может исчезать по мере их культивирования [25]. Так, клоны ММСК из пуповины, отличающиеся друг от друга интенсивностью самообновления и дифференцировочным потенциалом *in vitro*, дают дочерние клоны, которые постепенно утрачивают мультипотентность [25].

Во-вторых, свежесыведенные популяции ММСК могут содержать прогениторные клетки, уже коммитированные в различных направлениях дифференцировки. Так, результаты цитометрического анализа показали, что жировая ткань содержит по крайней мере 5 типов клеток-предшественников, отличающихся по экспрессии маркерных антигенов: субэндотелиальные прогениторные клетки (CD146⁺, CD140b⁺, NG2⁺, CD90^{+/+}, α-актин⁻, CD31⁻, CD34⁻), супраадвентициальные прогениторные клетки (NG2⁺, CD90⁺, CD34⁺, CD146⁻, α-актин⁻, CD31⁻) и транзиторные прогениторные клетки (CD146⁺, CD34⁺, NG2⁺, CD90⁺, CD31⁻), а также предшественники преадипоцитов (CD34⁺, CD184⁺, CD31⁻) и эндотелиальные прогениторные клетки (CD34⁺, CD146⁺, CD133⁺, CD202b⁺, CD309⁺, CD31⁻, CD90^{+/+}, α-актин⁻) [26]. Этим, по нашему мнению, и объясняется частое присутствие в первичной культуре ММСК островков эндотелия

(которые исчезают по мере культивирования), колоний сферической формы, сформированных мелкими, быстро делящимися, округлыми клетками, а также очень медленно делящихся, крупных, распластаных клеток [27].

В-третьих, во всех тканях, помимо выделяемых МСК, содержатся минорные субпопуляции плюрипотентных клеток, обладающих более широким спектром дифференцировочных способностей, такие, как «очень мелкие эмбрионально-подобные клетки» (*very small embryonic-like [VSEL] cells*) [28], а также «мультипотентные постнатальные прогениторные клетки» (*multipotent adult progenitor cells, MAPC*) [29] и «устойчивые к стрессу клетки, способные к дифференцировке в нескольких направлениях» (*multilineage differentiating stress-enduring [MUSE] cells*) [30]. Наши данные свидетельствуют о присутствии «очень мелких эмбрионально-подобных клеток» в свежесыведенной популяции ММСК, однако вклад этих минорных популяций в дифференцировочный потенциал культуры ММСК остается спорным, поскольку не известно, поддерживается ли их рост и дифференцировка в условиях культивирования.

И, наконец, разногласия при анализе мультипотентности ММСК также могут быть обусловлены использованием разных методов выделения, культивирования и критериев оценки дифференцировки.

ММСК И РОСТ ТКАНЕЙ

Трансплантация ММСК стимулирует регенерацию тканей, включая кость, скелетную мускулатуру, миокард, кожу, печень и периферические нервы. Согласно нашим данным, этот эффект обусловлен как интеграцией трансплантированных ММСК в ткани реципиента, так и секреторной активностью этих клеток [31]. Мы показали, что трансплантированные МСК встраиваются в эндотелиальную выстилку растущих капилляров, а также в периэндотелиальное пространство вновь образующихся сосудов и стабилизируют их.

МСК служат важнейшим источником факторов роста и цитокинов, принимающих участие в регуляции регенерации тканей. Так, в костном мозге именно МСК продуцируют факторы, необходимые для самоподдержания гемопоэтических стволовых клеток и удержания их в нише, включая SDF-1α (фактор стромы-1α), SCF (фактор стволовых клеток), ангиопоэтин-1 и интерлейкин-7 [32]. В нашей лаборатории было установлено, что МСК продуцируют ангиогенные и нейротрофные факторы роста, включая VEGF (фактор роста сосудистого эндотелия), bFGF (основной фактор роста фибробластов), HGF (фактор роста гепатоцитов), ангиопоэтин, NGF (фактор роста нервов), BDNF (нейротрофный фактор головного

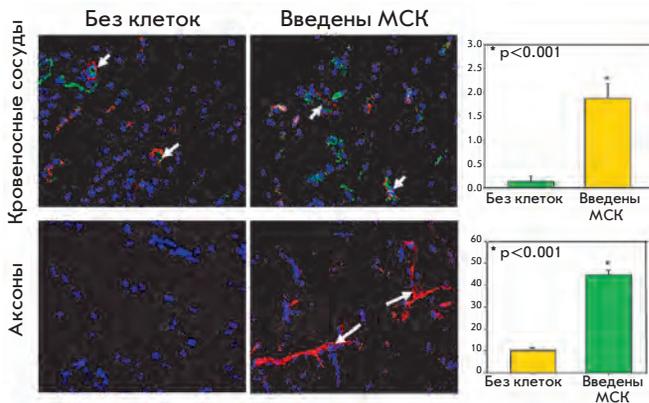


Рис. 2. Стимуляция роста кровеносных сосудов и аксонов под действием МСК. МСК жировой ткани были трансплантированы сингенным мышам в составе подкожных имплантатов матригеля. Плотность кровеносных сосудов (верхний ряд) и аксонов (нижний ряд) оценивали с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания замороженных срезов подкожных имплантатов антителами против маркеров эндотелия (CD31, зеленое окрашивание) и перицитов (NG2, красное окрашивание) или белка цитоскелета аксонов (NF200, красное окрашивание). Ядра клеток докрашены DAPI. Короткими стрелками отмечены зрелые кровеносные сосуды, длинными стрелками – аксоны. На диаграммах приведены результаты морфометрического анализа суммарной длины кровеносных сосудов (верхний ряд) и аксонов (нижний ряд) [33, 34].

мозга) и GDNF (нейротрофный фактор глиальных клеток) [33, 34]. Ангиогенные факторы роста, продуцируемые ММСК в области трансплантации, стимулируют деление эндотелиальных клеток, их миграцию и формирование сосудов. Кроме того, факторы, продуцируемые ММСК, способствуют мобилизации из костного мозга эндотелиальных предшественников, участвующих в образовании новых сосудов [34, 35]. В то же время нейротрофные факторы, продуцируемые ММСК, стимулируют рост и восстановление нервных окончаний [33]. Таким образом, МСК могут опосредовать координированную регуляцию роста кровеносных сосудов и нервов в процессах регенерации и ремоделирования тканей (рис. 2).

Нами получены данные, свидетельствующие о том, что ММСК продуцируют необходимые для функционального созревания сосудов и их стабилизации факторы, включая bFGF, PDGF-BB (фактор роста тромбоцитов-BB) и TGF- β (трансформирующий фактор роста- β) [18, 34, 36]. Так, PDGF-BB вызывает ветвление растущих кровеносных сосудов и привлечение к ним перицитов, гладкомышечных и мезенхимальных клеток, а TGF- β стимулирует диффе-

ренцировку гладкомышечных клеток и продукцию компонентов внеклеточного матрикса сосудистой стенки [37].

Продукция факторов роста и цитокинов в МСК многократно возрастает при повреждении органов и тканей. Гипоксия вызывает координированное изменение экспрессии генов в ММСК: содержание мРНК проангиогенных факторов, включая VEGF, PlGF, HGF, bFGF, PDGF-BB и TGF- β , возрастает в 2–4 раза, а мРНК антиангиогенных факторов, таких, как PAI-1, ангиостатин и тромбоспондин, снижается более чем в 2 раза [34]. ММСК также секретируют нейротрофические факторы, включая NGF, BDNF и GDNF, которые обуславливают стимуляцию роста и регенерации нервных волокон, вызванную трансплантацией этих клеток [33, 38].

Секреторная активность ММСК также влияет на их иммуномодулирующие свойства. На нескольких животных моделях показано, что инъекции культивируемых ММСК вызывают иммуносупрессию *in vivo* [39]. В основе иммуносупрессорного действия ММСК лежит подавление функции иммунных клеток: активации Т-клеток, дифференцировки дендритных клеток, пролиферации В-клеток, а также цитолитической активности натуральных киллеров. Иммуносупрессорные свойства этих клеток опосредованы как секрецией растворимых факторов, включая интерлейкин-10, простагландин-E₂, оксид азота, TGF- β ₁, а также галектины-1 и -3, так и непосредственным межклеточным контактом ММСК с иммунными клетками [40]. Кроме того, ММСК могут способствовать дифференцировке наивных Т-хелперов в регуляторные Т-клетки, а также привлекать зрелые регуляторные Т-клетки [39, 40]. Колокализация МСК костного мозга с дендритными клетками и циркулирующими В-клетками в перисинусоидальном пространстве [41, 42] позволяет предположить, что МСК принимают участие в регуляции функциональной активности и созревания иммунных клеток.

ММСК И ОПУХОЛЕВЫЙ РОСТ

Примером патологического ремоделирования тканей является рост опухоли и опухолевый ангиогенез. Известно, что мезенхимальные клетки могут взаимодействовать с опухолевыми клетками как поддерживающая, так и подавляющая рост опухолей *in vitro* и *in vivo*. Так, было показано, что *in vitro* ММСК костного мозга стимулируют пролиферацию клеток рака поджелудочной железы [43], в то время как ММСК из подкожной жировой клетчатки подавляют пролиферацию клеток первичного лейкоза [44]. На животных моделях обнаружено, что ММСК стимулируют приживание и рост опухолей при совместном введении с клетками меланомы [45–47], рака молочной

железы [48], предстательной железы [49] и кишечника [50, 51], а также повышают вероятность формирования метастазов [52]. По-видимому, стимулирующее влияние ММСК обусловлено секрецией хемокинов (CCL5, SDF-1 α) и ангиогенных факторов роста (VEGF), а также антиапоптотическим действием на опухолевые клетки. Кроме того, ММСК способны мигрировать в опухолевую ткань и участвовать в формировании ее стромы. Так, ММСК в опухолях дифференцируются в фибробласты, эндотелиальные клетки и перициты, что и стимулирует опухолевый рост [46, 53]. Кроме того, ММСК способны секретировать цитокины, факторы роста и ангиогенные факторы [34, 43], что также стимулирует рост опухолей за счет повышения их васкуляризации.

Однако в этих же и других моделях ММСК при определенных условиях могут также подавлять опухолевый рост. В основе такого действия ММСК могут лежать такие механизмы, как стимуляция воспалительной реакции в организме реципиента в случае рака толстого кишечника [50], активация сигнальных путей Akt и Wnt – в клетках саркомы Капоши, гепатомы и рака молочной железы [54–56], арест в G1-фазе клеточного цикла – в клетках рака поджелудочной железы, гепатомы и лимфомы [44, 57], индукция апоптоза опухолевых и эндотелиальных клеток – в гепатоме и неходжкинской лимфоме [44, 58], а также подавление ангиогенеза на модели меланомы мыши B16F10 [57]. Системное введение ММСК экспериментальным животным с индуцированным сформировавшимся раком поджелудочной железы приводило к апоптозу опухолевых клеток *in vitro* и подавлению роста опухоли *in vivo* [57].

Данные, полученные при изучении влияния МСК на рост опухолей, свидетельствуют о том, что активация МСК, их направленная миграция и дифференцировка в клетки соединительной ткани и кровеносных сосудов, а также взаимодействие с иммунными клетками являются важными составляющими процессов онкогенеза.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ МСК *IN VIVO*

Распределение МСК в тканях долгое время оставалось не изученным [13, 32], поскольку доля этих клеток в тканях весьма невелика, а уникальный иммунофенотип, позволяющий отделить их от остальных клеток, не был определен. Новые маркерные антигены МСК были установлены благодаря оценке способности клеток, выделенных из тканей на основании экспрессии тех или иных белков, к самообновлению и дифференцировке *in vivo*.

Недавно обнаружили, что в костном мозге мыши критериям МСК соответствуют клетки, экспрессирующие Sca-1 (антиген стволовых клеток-1) и PDGFR α

(рецептор фактора роста тромбоцитов α). Эти клетки формировали костную ткань и функциональную строму для ГСК при гетеротопической трансплантации под кожу, а также образовывали остеобласты, ретикулярные клетки и адипоциты в костном мозге после системной трансплантации облученному реципиенту [13]. С помощью аналогичного подхода установили, что маркером МСК костного мозга может служить и нестин [32], поскольку экспрессирующие нестин клетки обладали способностью к самообновлению *in vitro* и *in vivo*, дифференцировались в остеобласты и хондроциты в костном мозге *in vivo*, а также формировали гемопоэтическое микроокружение при трансплантации под кожу [59].

С помощью новых маркерных антигенов (CD146, Sca-1 и PDGFR α) показано, что МСК *in situ* локализуются в непосредственной близости от кровеносных сосудов, в частности в адвентиции артерий, кровоснабжающих костный мозг. Более того, клетки, выделенные на основании их периваскулярной локализации и экспрессии маркеров перицитов – NG2 (хондротинсульфат протеогликан), CD146 и PDGFR β , из различных органов и тканей человека, включая фетальную и постнатальную кожу, поджелудочную железу, сердце, мозг, легкие, костный мозг и плаценту, обладали способностью к самоподдержанию, дифференцировочным потенциалом и экспрессионным профилем, присущим МСК [60].

В настоящее время считается, что клетки, несущие маркерные антигены МСК и перицитов *in vivo*, обнаруживаются вблизи кровеносных сосудов, в жировой ткани и пульпе зуба [61, 62].

Несмотря на сходство в локализации и экспрессии поверхностных маркеров, способности дифференцироваться *in vitro* в остеобласты, хондроциты, адипоциты, миоциты и гладкомышечные клетки, а также формировать очаги эктопического остеогенеза *in vivo* [60], вопрос о биологической эквивалентности МСК и перицитов по-прежнему остается открытым.

Так, не ясно, способны ли МСК *in vivo* выполнять все функции перицитов, включая стабилизацию капилляров, фагоцитоз, а также регуляцию проницаемости и тонуса кровеносных сосудов, в том числе и за счет рецепции сигналов симпатической нервной системы [63]. Скорее всего, периваскулярное пространство кровеносных сосудов содержит гетерогенные популяции клеток. При этом, по-видимому, только часть перицитов действительно может представлять собой МСК *in vivo*. Периваскулярная локализация не уникальна для МСК, ранее она была описана для резидентных стволовых или прогениторных клеток: ГСК, преадипоцитов и стволовых клеток скелетных мышц в костном мозге, жировой ткани и скелетных мышцах [64–67]. Локализация МСК в пери-

эндотелиальном пространстве свидетельствует о том, что эндотелий является важным компонентом ниши этих клеток, способным регулировать их функциональную активность [68].

МСК – КОМПОНЕНТЫ НИШИ ТКАНЕСПЕЦИФИЧНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

В настоящий момент активно изучается функция МСК в различных тканях. В костном мозге МСК не только обеспечивают обновление стромы, но и служат важнейшим регулятором кроветворения и функции ГСК. ГСК в костном мозге располагаются в определенном микроокружении (нишах), состоящем из негемопоэтических клеток, растворимых факторов и белков внеклеточного матрикса, которые регулируют гемопоэз [69]. В самом начале изучения МСК показали, что *in vivo* эти клетки источник остеобластов, адипоцитов и ретикулярных клеток – компонентов ниши для ГСК, участвующих в регуляции гемопоэза [3]. Кроме того, МСК первыми заселяют участки фетального гемопоэза, они передают регуляторные сигналы, привлекающие туда ГСК [70]. Культивируемые ММСК костного мозга также способны поддерживать выживание и пролиферацию ГСК *ex vivo* [70].

Остеобласты представляют собой необходимый компонент гемопоэтического микроокружения [71, 72]. Количество остеобластов в костном мозге положительно коррелирует с количеством ГСК [73] – около 14% ГСК располагаются в непосредственной близости от эндоста (endosteum), выстланного остеобластами [65]. Способность остеобластов регулировать самоподдержание и активацию ГСК до сих пор окончательно не доказана, однако, получен ряд данных *in vitro* о том, что эти клетки регулируют дифференцировку ГСК в гранулоциты и В-лимфоциты посредством секреции растворимых факторов роста и цитокинов, включая LIF-1 (фактор-1, ингибирующий лейкоз), GM-CSF (гранулоцитарный колоние-стимулирующий фактор), SDF-1 и интерлейкин-6 [69]. Наряду с остеобластами, строма костного мозга содержит адипоциты, также происходящие из МСК. Интересно, что адипоциты функционируют в костном мозге как отрицательные регуляторы гемопоэза, действуя по не известным пока молекулярным механизмам [74]. Следовательно, в костном мозге МСК служат источником двух типов клеток, проявляющих антагонистические свойства в отношении регуляции ГСК, остеобластов и адипоцитов. Остается не известным, что обуславливает выбор между коммитированностью МСК в том или ином направлении, и как баланс между продукцией остеобластов и адипоцитов влияет на гемопоэз [12].

МСК также могут регулировать гемопоэтическое микроокружение, организуя сосудистую сеть в кост-

ном мозге – необходимый структурный и функциональный компонент ниш ГСК [69]. В двух независимых исследованиях показано существование «двойственных ниш стволовых клеток», в которых два типа стволовых клеток, ГСК и МСК, непосредственно взаимодействуют в периваскулярных пространствах костного мозга. В частности, установлено, что большинство ГСК располагается на расстоянии не более 30 мкм (~ 5 диаметров ГСК) от ретикулярных клеток, продуцирующих большое количество SDF-1 α , а также содержащих нестин [13, 32]. Как уже сказано, эти клетки являются МСК или их ближайшими потомками, поскольку они способны к самоподдержанию и дифференцировке в остеогенном и адипогенном направлениях *in vitro* и *in vivo*.

Нестинположительные МСК экспрессируют факторы, необходимые для удержания ГСК в нише и их самоподдержания, в количестве в 50–700 раз больше, чем остальные стромальные клетки костного мозга. Кроме того, нестинсодержащие МСК поддерживают рост колоний ГСК *in vitro*, а их удаление вызывает резкое уменьшение количества ГСК *in vivo*.

К отличительным особенностям нестинэкспрессирующих МСК костного мозга относятся экспрессия β 3-адренорецепторов и способность отвечать на сигналы нервной системы. Агонисты β 3- и β 2-адренорецепторов вызывают подавление экспрессии SDF-1 α , SCF, ангиопоэтина-1 и интерлейкина-7 в нестинэкспрессирующих МСК, что, в свою очередь, вызывает мобилизацию ГСК. Таким образом осуществляется регуляция гемопоэза нервной системой.

Со времен Вирхова было известно, что перициты, имеющие периэндотелиальную локализацию, могут служить мишенями для окончаний аксонов и тем самым играть ключевую роль в сопряжении нервной и сосудистой систем [75]. Как уже подчеркивалось выше, часть перицитов представлена МСК. В этой связи выполняемая МСК функция сопряжения компартмента ГСК и нервной системы хорошо согласуется с их периваскулярной локализацией (рис. 3).

МСК костного мозга служат также мишенью для клеток врожденного иммунитета, таких, как макрофаги. В отличие от стимулирующего мобилизацию действия нервной системы, макрофаги костного мозга способствуют удержанию ГСК в нише [76].

Являются ли МСК других тканей компонентом ниш для тканеспецифичных резидентных стволовых клеток и опосредуют ли в этих нишах влияние нервной системы, остается неясным. Так, МСК, выделенные из миокарда, оказались способны стимулировать выживание и пролиферацию стволовых клеток сердца *in vitro* [77], однако, взаимодействие этих клеток с тканеспецифичными стволовыми клетками *in vivo* остается невыясненным [78]. В тонком



Рис. 3. Схема взаимодействия МСК с аксонами, эндотелиальными клетками, лейкоцитами и тканеспецифичными стволовыми клетками (см. пояснения в тексте).

кишечнике и коже также обнаружены популяции МСК, ответственных за регуляцию трофики и восстановления этих тканей при повреждении. Однако насколько важно их взаимодействие с тканеспецифичными стволовыми клетками для процессов обновления тканей еще предстоит выяснить. По крайней мере в костном мозге МСК – это необходимый компонент периваскулярной ниши тканеспецифичных

резидентных стволовых клеток (в данном случае – ГСК), позволяющий интегрировать сигналы нервной и иммунной систем и периферического кровотока.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приведенные результаты позволяют нам предположить, что в организме существуют два типа МСК: циркулирующие в крови МСК костномозгового происхождения, которые принимают участие в репарации тканей при повреждении, и резидентные МСК, локализованные периваскулярно во всех органах и тканях, которые регулируют физиологическое обновление тканей и поддержание тканевого гомеостаза. МСК считаются важнейшими участниками процессов обновления и регенерации тканей. Во-первых, эти клетки осуществляют регуляцию самоподдержания и дифференцировки тканеспецифичных стволовых клеток. Во-вторых, МСК стимулируют рост и осуществляют стабилизацию кровеносных сосудов и нервов в процессах репарации тканей. В-третьих, взаимодействие МСК с лимфоцитами, эндотелиальными клетками и аксонами позволяет интегрировать нейрогуморальные сигналы, регулирующие обновление и репарацию тканей. ●

Работа выполнена в рамках Государственного контракта № 16.512.12.2005 и при поддержке гранта РФФИ № 11-04-12107-офи-м-2011.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Maximov A.A. // Folia Haematologica. 1909. V. 8. P. 125–134.
- Becker A.J., Mc C.E., Till J.E. // Nature. 1963. V. 197. P. 452–454.
- Friedenstein A.J., Piatetzky S., Petrakova K.V. // J. Embryol. Exp. Morphol. 1966. V. 16. P. 381–390.
- Friedenstein A.J., Chailakhjan R.K., Lalykina K.S. // Cell Tissue Kinet. 1970. V. 3. P. 393–403.
- Weissman I.L. // Cell. 2000. V. 100. P. 157–168.
- Caplan A.I. // Clin. Plast Surg. 1994. V. 21. P. 429–435.
- Prockop D.J. // Science. 1997. V. 276. P. 71–74.
- Caplan A.I. // J. Orthop. Res. 1991. V. 9. P. 641–650.
- da Silva Meirelles L., Chagastelles P.C., Nardi N.B. // J. Cell Sci. 2006. V. 119. P. 2204–2213.
- Young H.E. // Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2004. V. 280. P. 71–109.
- Giannoudis P.V., Goff T., Roshdy T., Jones E., McGonagle D. // Injury. 2010. V. 41. P. 1099–1102.
- Nombela-Arrieta C., Ritz J., Silberstein L.E. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2011. V. 12. P. 126–131.
- Morikawa S., Mabuchi Y., Kubota Y., Nagai Y., Niibe K., Hiratsu E., Suzuki S., Miyauchi-Hara C., Nagoshi N., Sunabori T., et al. // J. Exp. Med. 2009. V. 206. P. 2483–2496.
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D., Horwitz E. // Cytotherapy. 2006. V. 8. P. 315–317.
- Mosna F., Sensebe L., Krampera M. // Stem Cells Dev. 2010. V. 19. P. 1449–1470.
- Panepucci R.A., Siufi J.L., Silva W.A., Jr., Proto-Siquiera R., Neder L., Orellana M., Rocha V., Covas D.T., Zago M.A. // Stem Cells. 2004. V. 22. P. 1263–1278.
- Lee R.H., Kim B., Choi I., Kim H., Choi H.S., Suh K., Bae Y.C., Jung J.S. // Cell Physiol. Biochem. 2004. V. 14. P. 311–324.
- Ефименко А.Ю., Старостина Е.Е., Рубина К.А., Калинина Н.И., Парфенова Е.В. // Цитология. 2010. Т. 52. С. 144–154.
- Li F., Wang X., Niyibizi C. // Bone. 2010. V. 47. P. 546–555.
- Konno M., Hamazaki T.S., Fukuda S., Tokuhara M., Uchiyama H., Okazawa H., Okochi H., Asashima M. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2010. V. 400. P. 461–465.
- Tan G., Shim W., Gu Y., Qian L., Chung Y.Y., Lim S.Y., Yong P., Sim E., Wong P. // Differentiation. 2010. V. 7. P. 260–271.
- Banas A., Teratani T., Yamamoto Y., Tokuhara M., Takeshita F., Osaki M., Kato T., Okochi H., Ochiya T. // J. Gastroenterol. Hepatol. 2009. V. 24. P. 70–77.
- Park B.W., Kang D.H., Kang E.J., Byun J.H., Lee J.S., Maeng G.H., Rho G.J. // J. Tissue Eng. Regen. Med. 2011, in press, doi: 10.1002/term.404.
- Alvarez-Dolado M., Pardo R., Garcia-Verdugo J.M., Fike J.R., Lee H.O., Pfeffer K., Lois C., Morrison S.J., Alvarez-Buylla A. // Nature. 2003. V. 425. P. 968–973.
- Muraglia A., Cancedda R., Quarto R. // J. Cell Sci. 2000. V. 113 (Pt 7). P. 1161–1166.
- Tallone T., Realini C., Bohmler A., Kornfeld C., Vassalli G., Moccetti T., Bardelli S., Soldati G. // J. Cardiovasc. Transl. Res. 2011. V. 4. P. 200–210.
- Haasters F., Prall W.C., Anz D., Bourquin C., Pautke C.,

- Endres S., Mutschler W., Docheva D., Schieker M. // *J. Anat.* 2009. V. 214. P. 759–767.
28. Ratajczak J., Wysoczynski M., Zuba-Surma E., Wan W., Kucia M., Yoder M.C., Ratajczak M.Z. // *Exp. Hematol.* 2011. V. 39. P. 225–237.
29. Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L., Schwartz R.E., Keene C.D., Ortiz-Gonzalez X.R., Reyes M., Lenvik T., Lund T., Blackstad M., Du J., Aldrich S., Lisberg A., Low W.C., Largaespada D.A., Verfaillie C.M. // *Nature.* 2002. V. 41. P. 41–49.
30. Kuroda Y., Kitada M., Wakao S., Nishikawa K., Tanimura Y., Makinoshima H., Goda M., Akashi H., Inutsuka A., Niwa A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. P. 8639–8643.
31. Tolar J., Le Blanc K., Keating A., Blazar B.R. // *Stem Cells.* 2010. V. 28. P. 1446–1455.
32. Mendez-Ferrer S., Michurina T.V., Ferraro F., Mazloom A.R., Macarthur B.D., Lira S.A., Scadden D.T., Ma'ayan A., Enikolopov G.N., Frenette P.S. // *Nature.* 2010. V. 466. P. 829–834.
33. Lopatina T., Kalinina N., Karagyaour M., Stambolsky D., Rubina K., Revischin A., Pavlova G., Parfyonova Y., Tkachuk V. // *PLoS One.* 2011. V. 6. P. e17899.
34. Rubina K., Kalinina N., Efimenko A., Lopatina T., Melikhova V., Tsokolaeva Z., Sysoeva V., Tkachuk V., Parfyonova Y. // *Tissue Eng. Part A.* 2009. V. 15. P. 2039–2050.
35. Kinnaird T., Stabile E., Burnett M.S., Lee C.W., Barr S., Fuchs S., Epstein S.E. // *Circ. Res.* 2004. V. 94. P. 678–685.
36. Рубина К.А., Калинина Н.И., Ефименко А.Ю., Лопатина Т.В., Мелихова В.С., Цоколаева З.И., Сысоева В.Ю., Ткачук В.А., Парфенова Е.В. // *Кардиология.* 2010. Т. 50. С. 51–61.
37. Semenza G.L. // *J. Cell Biochem.* 2007. V. 102. P. 840–847.
38. Cai L., Johnstone B.H., Cook T.G., Tan J., Fishbein M.C., Chen P.S., March K.L. // *Stem. Cells.* 2009. V. 27. P. 230–237.
39. Uccelli A., Moretta L., Pistoia V. // *Nat. Rev. Immunol.* 2008. V. 8. P. 726–736.
40. Sioud M. // *Scand. J. Immunol.* 2011. V. 73. P. 79–84.
41. Pillai S., Cariappa A. // *Immunol. Cell. Biol.* 2009. V. 87. P. 16–19.
42. Sapozhnikov A., Pewzner-Jung Y., Kalchenko V., Krauthgamer R., Shachar I., Jung S. // *Nat. Immunol.* 2008. V. 9. P. 388–395.
43. Beckermann B.M., Kallifatidis G., Groth A., Frommhold D., Apel A., Mattern J., Salnikov A.V., Moldenhauer G., Wagner W., Diehlmann A., et al. // *J. Cancer.* 2008. V. 9. P. 622–631.
44. Zhu Y., Sun Z., Han Q., Liao L., Wang J., Bian C., Li J., Yan X., Liu Y., Shao C., Zhao R.C. // *Leukemia.* 2009. V. 23. P. 925–933.
45. Djouad F., Bony C., Apparailly F., Louis-Plence P., Jorgensen C., Noel D. // *Transplantation.* 2006. V. 82. P. 1060–1066.
46. Djouad F., Plence P., Bony C., Tropel P., Apparailly F., Sany J., Noel D., Jorgensen C. // *Blood.* 2003. V. 102. P. 3837–3844.
47. Kucerova L., Matuskova M., Hlubinova K., Altanerova V., Altaner C. // *Mol. Cancer.* 2010. V. 9. P. 129.
48. Karnoub A.E., Dash A.B., Vo A.P., Sullivan A., Brooks M.W., Bell G.W., Richardson A.L., Polyak K., Tubo R., Weinberg R.A. // *Nature.* 2007. V. 449. P. 557–563.
49. Prantl L., Muehlberg F., Navone N.M., Song Y.H., Vykoukal J., Logothetis C.J., Alt E.U. // *Prostate.* 2010. V. 70. P. 1709–1715.
50. Torsvik A., Rosland G.V., Svendsen A., Molven A., Immervoll H., McCormack E., Lonning P.E., Primon M., Sobala E., Tonn J.C., et al. // *Cancer Res.* 2010. V. 70. P. 6393–6396.
51. Zhu W., Xu W., Jiang R., Qian H., Chen M., Hu J., Cao W., Han C., Chen Y. // *Exp. Mol. Pathol.* 2006. V. 80. P. 267–274.
52. Shinagawa K., Kitada Y., Tanaka M., Sumida T., Kodama M., Higashi Y., Tanaka S., Yasui W., Chayama K. // *Int. J. Cancer.* 2010. V. 127. P. 2323–2333.
53. Spaeth E.L., Dembinski J.L., Sasser A.K., Watson K., Klopp A., Hall B., Andreeff M., Marini F. // *PLoS One.* 2009. V. 4. P. e4992.
54. Khakoo A.Y., Pati S., Anderson S.A., Reid W., Elshal M.F., Rovira I.I., Nguyen A.T., Malide D., Combs C.A., Hall G., et al. // *J. Exp. Med.* 2006. V. 203. P. 1235–1247.
55. Qiao L., Xu Z., Zhao T., Zhao Z., Shi M., Zhao R.C., Ye L., Zhang X. // *Cell Res.* 2008. V. 18. P. 500–507.
56. Qiao L., Xu Z.L., Zhao T.J., Ye L.H., Zhang X.D. // *Cancer Lett.* 2008. V. 269. P. 67–77.
57. Cousin B., Ravet E., Poglio S., De Toni F., Bertuzzi M., Lulka H., Touil I., Andre M., Grolleau J.L., Peron J. M., et al. // *PLoS One.* 2009. V. 4. P. e6278.
58. Secchiero P., Zorzet S., Tripodo C., Corallini F., Melloni E., Caruso L., Bosco R., Ingraio S., Zavan B., Zauli G. // *PLoS One.* 2010. V. 5. P. e11140.
59. Sacchetti B., Funari A., Michienzi S., Di Cesare S., Piersanti S., Saggio I., Tagliafico E., Ferrari S., Robey P.G., Riminucci M., Bianco P. // *Cell.* 2007. V. 131. P. 324–336.
60. Crisan M., Yap S., Casteilla L., Chen C.W., Corselli M., Park T.S., Andriolo G., Sun B., Zheng B., Zhang L., et al. // *Cell Stem Cell.* 2008. V. 3. P. 301–313.
61. Shi S., Gronthos S. // *J. Bone Miner. Res.* 2003. V. 18. P. 696–704.
62. Corselli M., Chen C.W., Crisan M., Lazzari L., Peault B. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2010. V. 30. P. 1104–1109.
63. Dore-Duffy P. // *Curr. Pharm. Des.* 2008. V. 14. P. 1581–1593.
64. Tang W., Zeve D., Suh J.M., Bosnakovski D., Kyba M., Hammer R.E., Tallquist M.D., Graff J.M. // *Science.* 2008. V. 322. P. 583–586.
65. Kiel M.J., Yilmaz O.H., Iwashita T., Terhorst C., Morrison S.J. // *Cell.* 2005. V. 121. P. 1109–1121.
66. Dellavalle A., Sampaolesi M., Tonlorenzi R., Tagliafico E., Sacchetti B., Perani L., Innocenzi A., Galvez B.G., Messina G., Morosetti R., et al. // *Nat. Cell Biol.* 2007. V. 9. P. 255–267.
67. Traktuev D.O., Merfeld-Clauss S., Li J., Kolonin M., Arap W., Pasqualini R., Johnstone B.H., March K.L. // *Circ. Res.* 2008. V. 102. P. 77–85.
68. Saleh F.A., Whyte M., Ashton P., Genever P.G. // *Stem Cells Dev.* 2010. V. 20. P. 391–403.
69. Garrett R.W., Emerson S.G. // *Cell Stem Cell.* 2009. V. 4. P. 503–506.
70. Mendes S.C., Robin C., Dzierzak E. // *Development.* 2005. V. 132. P. 1127–1136.
71. Lo Celso C., Fleming H.E., Wu J.W., Zhao C.X., Miale-Lye S., Fujisaki J., Cote D., Rowe D.W., Lin C.P., Scadden D.T. // *Nature.* 2009. V. 457. P. 92–96.
72. Xie Y., Yin T., Wiegand W., He X.C., Miller D., Stark D., Perko K., Alexander R., Schwartz J., Grindley J.C., et al. // *Nature.* 2009. V. 457. P. 97–101.
73. Calvi L.M., Adams G.B., Weibrecht K.W., Weber J.M., Olson D.P., Knight M.C., Martin R.P., Schipani E., Divieti P., Bringham F.R., et al. // *Nature.* 2003. V. 425. P. 841–846.
74. Naveiras O., Nardi V., Wenzel P.L., Hauschka P.V., Fahey F., Daley G.Q. // *Nature.* 2009. V. 460. P. 259–263.
75. Armulik A., Genove G., Mae M., Nisancioglu M.H., Wallgard E., Niaudet C., He L., Norlin J., Lindblom P., Strittmatter K., et al. // *Nature.* 2010. V. 468. P. 557–561.
76. Chow A., Lucas D., Hidalgo A., Mendez-Ferrer S., Hashimoto D., Scheiermann C., Battista M., Leboeuf M., Prophete C., van Rooijen N., et al. // *J. Exp. Med.* 2011. V. 208. P. 261–271.
77. Lushaj E.B., Anstadt E., Haworth R., Roenneburg D., Kim J., Hematti P., Kohmoto T. // *Cytotherapy.* 2011. V. 13. P. 400–406.
78. Mazhari R., Hare J.M. // *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 2007. V. 4. Suppl 1. P. S21–26.

УДК 577.1:577.15

NAD⁺-зависимая формиатдегидрогеназа растений

А. А. Алексеева^{1,2,3}, С. С. Савин^{2,3}, В. И. Тишков^{1,2,3*}¹Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3²ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», 109559, Москва, Цимлянская ул., 16, оф. 96³Учреждение Российской академии наук Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33

*E-mail: vitishkov@gmail.com

Поступила в редакцию 05.08.2011 г.

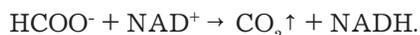
РЕФЕРАТ NAD⁺-зависимая формиатдегидрогеназа [КФ 1.2.1.2] (FDH), состоящая из двух идентичных субъединиц и не содержащая простетических групп и ионов металлов, широко распространена в природе. FDH этого типа найдены в различных микроорганизмах (включая патогенные) – в бактериях, дрожжах, микроскопических грибах, а также в растениях. В отличие от FDH микробного происхождения, находящихся в цитоплазме, растительные FDH локализованы в митохондриях. Впервые формиатдегидрогеназную активность описали еще в 1921 г. именно в растениях, однако до последнего времени растительные FDH были изучены существенно хуже, чем ферменты микроорганизмов. В представленном обзоре рассмотрены последние достижения в области изучения физиологической роли, свойств, структуры и белковой инженерии формиатдегидрогеназ растений.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА растительная формиатдегидрогеназа, физиологическая роль, свойства, структура, экспрессия, *Escherichia coli*, белковая инженерия.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ FDH – формиатдегидрогеназа; PseFDH, CboFDH – формиатдегидрогеназы бактерий *Pseudomonas* sp. 101 и дрожжей *Candida boidinii*; SoyFDH, AthFDH – растительные формиатдегидрогеназы из сои и *Arabidopsis thaliana*.

ВВЕДЕНИЕ

NAD⁺-зависимые формиатдегидрогеназы (FDH) [КФ 1.2.1.2] относятся к группе ферментов, катализирующих окисление формиат-иона до углекислого газа при сопряженном восстановлении NAD⁺ до NADH:



На основании различий в структуре можно выделить две большие группы FDH. В первую группу входят формиатдегидрогеназы анаэробных микроорганизмов и архебактерий. FDH этой группы представляют собой гетероолигомеры со сложной четвертичной структурой и высокой молекулярной массой. Для них характерны наличие в активном центре различных простетических групп (железосерные кластеры, ионы молибдена, вольфрама) и высокая чувствительность к кислороду [1, 2].

Вторую группу образуют NAD⁺-зависимые формиатдегидрогеназы, которые состоят из двух идентичных субъединиц, имеют по два активных центра и не содержат в белковой глобуле ни ионов металлов, ни простетических групп. FDH этой группы принад-

лежат к суперсемейству D-специфичных дегидрогеназ 2-оксикислот [3]. Реакция окисления формиата, катализируемая FDH этой группы, является простейшим примером дегидрирования карбонильных соединений, так как в каталитическом механизме отсутствует стадия переноса протона(ов), а также какие-либо другие стадии кислотно-основного катализа. Скорость реакции в целом ограничивается скоростью переноса гидрид-иона от субстрата на атом С-4 никотинамидного кольца [4]. Таким образом, FDH служит модельным ферментом для изучения механизма переноса гидрид-иона в активном центре дегидрогеназ, входящих в данное суперсемейство.

Активное и систематическое изучение FDH началось в начале 70-х гг. прошлого века и было в основном посвящено ферментам микроорганизмов. Физиологическая роль микробных FDH различна. Например, в метанолутилизирующих бактериях и дрожжах фермент участвует в снабжении клетки энергией, а в патогенных бактериях и микроскопических грибах FDH является белком стресса. Подробно свойства и белковая инженерия FDH рассмотрены в работах [5, 6].

NAD⁺-зависимые формиаатдегидрогеназы растений также относятся ко второй группе FDH. Исследования последних лет показали, что в растениях, как и в патогенных микроорганизмах, FDH также входит в число белков стресса, и ее синтез сильно возрастает в условиях засухи, при резком изменении температуры, облучении жестким ультрафиолетом, воздействии химических реагентов [7–9], гипоксии [10], а также патогенных микроорганизмов [11]. Важность физиологической роли этого фермента обуславливает необходимость изучения растительных FDH. В настоящее время нет ни одной публикации, в которой систематизированы данные о растительных FDH. В представленном обзоре рассмотрены основные особенности растительных формиаатдегидрогеназ, их кинетические свойства и стабильность, а также подробно описана физиологическая роль.

ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ, ЛОКАЛИЗАЦИЯ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ РАСТИТЕЛЬНЫХ FDH

Впервые растительную FDH обнаружили в бобах фасоли (*Phaseolus vulgaris*) в 1921 г. [12].

Первая попытка детально описать FDH и оценить роль этого фермента в метаболизме растений была предпринята Дэвисоном в 1951 г. [13] на примере формиаатдегидрогеназ из семян гороха и фасоли. Считалось, что роль FDH заключается в восстановлении NADH, который впоследствии расходуется на образование этанола, сукцината и глутамата в сопряженных реакциях. Таким образом, впервые была обозначена роль FDH как «поставщика» молекул NADH для удовлетворения различных потребностей клетки. В этой же работе было высказано предположение о механизмах появления формиаата в растительной клетке. Согласно первой гипотезе формиаат мог образоваться вместе с этанолом и уксусной кислотой в результате анаэробного дыхания. Согласно другой гипотезе формиаат мог образоваться в процессе окисления гликолевой кислоты, однако однозначные данные, подтверждающие метаболический путь, в ходе которого образуется формиаат, отсутствуют.

Первые опыты по определению локализации FDH в клетках растений были проведены в 1956 г. Оказалось, что формиаатдегидрогеназная активность присутствует прежде всего в митохондриях [14]. Однако в силу того, что исследуемые образцы были загрязнены другими органеллами, нельзя было однозначно утверждать, что FDH локализована именно в митохондриях. В 1960 г. показали, что FDH находится не только в семенах, но и в других частях растений. Формиаатдегидрогеназная активность выявлена в листьях капусты и шпината, корнях редиса и репы, почках цветной капусты, а также в плодах тыквы [15]. На листьях шпината показано, что в растительной

клетке существуют как минимум два пути окисления формиаата – с помощью FDH в митохондриях и пероксидазы в пероксисомах [16]. Отдельно установили, что при pH > 6 формиаат окисляется с помощью FDH в митохондриях, при более кислых значениях pH основную роль в окислении формиаата играет пероксидаза в пероксисомах. Позже установили, что в митохондриях FDH представлена не индивидуальной молекулой, а входит в белковый комплекс массой около 200 кДа [17]. В качестве возможных кандидатов на образование таких комплексов рассматриваются глициндекарбоксилаза и фумараза, концентрация которых возрастает синхронно с ростом активности FDH [9].

В ходе систематических исследований показано, что величина формиаатдегидрогеназной активности очень сильно зависит как от вида растения, так и от органа, в котором содержится фермент [18]. Также выявлена зависимость активности фермента от скорости потребления кислорода растением. Так, в растениях с высоким потреблением кислорода (шпинат, табак и др.) формиаатдегидрогеназная активность была выше, чем в растениях с низким потреблением (бобовые, зеленый салат и др.) [18]. В этой же работе впервые было высказано предположение, что в результате окисления NADH, полученного с помощью формиаатдегидрогеназной реакции, запасенная энергия по электрон-транспортной цепи расходуется на образование АТФ, удовлетворяя таким образом энергетическую потребность клетки [18]. К сожалению, большой разброс в активности FDH у растений разного вида не позволяет однозначно ответить на вопрос о роли этого фермента в метаболизме. Взаимосвязь метаболизма формиаата и ответа растений на стрессовые воздействия впервые отметили в 1978 г. [19], когда при выращивании ячменя в условиях избыточного увлажнения наблюдали повышенное образование меченого углекислого газа из формиаата.

На качественно новый уровень изучение физиологической роли формиаатдегидрогеназы растений перешло в 1992 г. [20], когда обнаружили, что митохондрии нефотосинтезирующих тканей картофеля содержат неизвестный полипептид с молекулярной массой около 40 кДа, составляющий до 9% всех белков митохондрий. кДНК этого полипептида клонировали в 1993 г., а анализ кодируемой этой кДНК аминокислотной последовательности показал, что она имеет более чем 55% гомологии с FDH из бактерий *Pseudomonas* sp. 101 [21]. Сравнение N-концевых последовательностей природной FDH картофеля и клонированного полипептида выявило в последнем присутствие сигнального пептида из 23 аминокислотных остатков, который обеспечивает транспорт профер-

мента из цитоплазмы в митохондрии. Полипептиды с такой же молекулярной массой найдены в растениях гороха, томата, лука и др., причем содержание FDH в митохондриях нефотосинтезирующих тканей (клубни, корни) было примерно в 8 раз выше, чем в листьях [20]. Кроме того, в растениях, выращенных без доступа света (стебли гороха, листья цикория, корни моркови, клубни батата и др.), количество FDH резко возрастало [20].

В настоящее время опубликованы многочисленные данные в пользу того, что FDH синтезируется в большом количестве в условиях, неблагоприятных для роста растений – при засухе, пониженной температуре, воздействии жесткого ультрафиолетового излучения, химических соединений, при недостатке света, железа, а также при пониженном содержании кислорода, однако скорость ответа сильно зависит от типа воздействия. Например, самый быстрый ответ растений картофеля, выраженный синтезом мРНК, наблюдали при непосредственном повреждении растительной ткани (около 20 мин), в то время как время ответа на другие воздействия составило в среднем 8 ч [7]. В условиях нехватки железа количество мРНК формиадегидрогеназы в корнях ячменя начинало увеличиваться через 1 день и достигало максимума через 14 дней [8, 22], тогда как в листьях синтез формиадегидрогеназы не увеличился. При анаэробном стрессе концентрация мРНК FDH в корнях ячменя повышалась уже через 12 ч и к 48 ч достигала максимального значения. У приморской сосны биосинтез FDH усиливается в условиях засухи [23]. Повышение уровня мРНК FDH отмечено и в растениях *Lotus japonicus*, росших в условиях гипоксии [10].

Экспрессия генов мха *Physcomitrella patens* в ответ на стрессовые воздействия изучена в работе [24]. Растения мха обрабатывали абсцизовой кислотой (гормон, индуцирующий переход растений к периоду покоя и способный тормозить рост стеблей; накапливается осенью в семенах и почках), а также охлаждали до +4°C. Обнаружено, что под действием абсцизовой кислоты увеличивается устойчивость мха к воздействию низких температур, а также изменяется набор экспрессируемых генов. FDH – один из ферментов, ген которых экспрессируется в ответ на абсцизовую кислоту. Оказалось, что уровень экспрессии гена FDH возрастает в течение нескольких часов после обработки абсцизовой кислотой, а также при содержании растений на холоду в течение 24 ч. В отсутствие абсцизовой кислоты ответ на воздействие низких температур развивается гораздо медленнее. Обработка хлоридом натрия в больших концентрациях (0.125 и 0.25 М) и маннита (0.25 и 0.5 М) увеличивала как устойчивость мха к действию низких температур, так и экспрессию ряда генов,

в том числе гена FDH. Таким образом, показано, что и у высших растений, и у мхов формиадегидрогеназа служит белком стресса, и уровень синтеза этого фермента может регулироваться гормонами. Другие растительные гормоны, такие, как ауксин и цитокинин, также влияют на активность FDH у высших растений [25].

Синтез FDH изучен и у *Arabidopsis thaliana*, подвергнутого различным воздействиям. Это первое растение, у которого определена полная нуклеотидная последовательность генома, поэтому во многих случаях *A. thaliana* используется как модельное растение. Растения опрыскивали различными С1-соединениями: метанолом, формальдегидом, формиатом, и проводили Нозерн-блот-анализ, используя кДНК FDH в качестве пробы. Наиболее интенсивная экспрессия гена FDH наблюдалась при обработке формальдегидом или метанолом. Более низкий уровень экспрессии наблюдался в образцах, опрысканных формиатом и деионизованной водой. Не обнаружено повышения экспрессии гена FDH в растениях с обрезанными листьями, а также в контрольном экземпляре. Эти данные позволили сделать вывод о том, что синтез FDH индуцируется в большей степени не субстратом – формиатом, а его восстановленной формой – формальдегидом [26]. Показано также [27], что одноуглеродные соединения – метанол, формальдегид и формиат, индуцируют синтез FDH в листьях растений. Метанол влияет непосредственно на синтез FDH-транскриптов, в то время как его окисленные модификации (формальдегид, формиат) могут служить сигнальными молекулами. Анализ N-концевой области фермента позволил предположить, что FDH может транспортироваться и в хлоропласты. Двойная локализация FDH – и в митохондриях, и в хлоропластах, показана на трансгенных растениях *A. thaliana* и табака, содержащих ген *AthFDH* [28].

Невыясненным остается происхождение формиата в клетках растений, подвергнутого стрессовым воздействиям. Были высказаны предположения, что формиат может синтезироваться в процессе фотодыхания, метаболизма метанола, а также из глиоксилата, образующегося из различных продуктов цикла Кребса [7]. Обсуждалось образование формиата из серина, как это происходит в бактериях [1], поскольку добавление серина приводило к увеличению концентрации FDH в растениях картофеля. В ходе дальнейших экспериментов [29] получен трансгенный картофель, в котором подавлен синтез FDH. Оказалось, что в тканях трансгенных растений накапливается формиат, который не окисляется в дальнейшем до углекислого газа. Показано также, что в условиях засухи в трансгенном картофеле образуется большое количество пролина и его предшественника – глутамата.

Метаболизм формиата и его физиологическая роль хорошо изучены [30]. В фотосинтезирующих тканях картофеля формиат служит главным предшественником всех других углеродсодержащих соединений, и синтезируется он главным образом через ферредоксин-зависимую фиксацию углекислого газа. В других тканях формиат является побочным продуктом фотодыхания и неких ферментативных процессов, его образование, по-видимому, может быть результатом непосредственного восстановления углекислого газа в хлоропластах. В растениях картофеля метаболизм формиата связан с синтезом серина.

Тесная взаимосвязь между биосинтезом формиата и серина существует и у *A. thaliana* [31]. Получены три линии трансгенных растений с повышенной экспрессией FDH. Уровень формиата в трансгенных растениях был практически таким же, как и в *A. thaliana* дикого типа. При добавлении меченого формиата образование радиоактивно меченого углекислого газа в трансгенных растениях происходило гораздо интенсивнее, в то время как накопление серина оставалось на прежнем уровне. Трансгенные растения *A. thaliana* с повышенным уровнем экспрессии гена FDH получены и в работе [32].

Фосфорилирование – важнейший способ регуляции метаболизма. Известно 14 белков митохондрий картофеля, которые могут находиться в фосфорилированном виде [33], в том числе и FDH. Идентифицированы аминокислотные остатки митохондриальной FDH картофеля, которые подвергаются фосфорилированию – Thr76 и Thr333 [34]. Анализ структуры FDH показал, что эти два остатка треонина находятся на поверхности белковой глобулы и могут быть легко доступны для киназ, катализирующих процесс фосфорилирования. Высокий уровень фосфорилирования наблюдается и в субъединице E1- α пируватдегидрогеназы (ПДГ). Фосфорилирование как FDH, так и пируватдегидрогеназы регулируется изменением концентрации NAD^+ , формиата и пирувата, что говорит о сходстве в механизмах регуляции работы этих ферментов. При повышении концентрации NAD^+ , формиата и пирувата уровень фосфорилирования фермента сильно снижается. Предполагается, что пируват может превращаться в формиат в реакции, катализируемой пируват-формиатлиазой (ПФЛ), а далее формиат окисляется при участии FDH.

Как видно из представленных данных, формиат-ион вовлечен в большое количество сложно регулируемых метаболических процессов. Наиболее полную схему участия формиата в метаболизме растений можно найти в работе [11].

Исследования последних лет свидетельствуют, что содержание FDH в митохондриях растений воз-

растает в ответ не только на физические и химические факторы, но и при «биологической атаке». Активацию биосинтеза FDH наблюдали при заражении дуба черешчатого (*Quercus robur*) патогенным грибом *Piloderma croceum* [35], пшеницы – грибом *Blumeria graminis f. sp. tritici* [36] и фасоли (*P. vulgaris*) – грибом *Colletotrichum lindemuthianum* [11]. В геноме фасоли имеются три гена FDH, и их экспрессия регулируется типом воздействия. Предполагают, что синтез FDH у пшеницы индуцируется метанолом в результате воздействия пектинметилэстеразы на пектин. В растениях табака *Nicotiana attenuate*, поврежденных гусеницами *Manduca sexta*, происходит выделение конъюгатов жирных кислот, которые запускают синтез ряда белков, в том числе и FDH [37].

В заключение этого раздела отметим, что формиатдегидрогеназа – это универсальный фермент, вовлеченный в ответ клеток на стресс, вызванный как экзогенными (негативные воздействия окружающей среды), так и эндогенными (нехватка важнейших микроэлементов, воздействие патогенов) процессами. Это свидетельствует о ключевой роли FDH в процессах метаболизма высших растений. Получение мутантных форм FDH, обладающих повышенной каталитической активностью, и встраивание их генов в геном растений вместо генов ферментов дикого типа открывает принципиально новый подход к созданию растений с повышенной устойчивостью к стрессовым воздействиям.

ОСОБЕННОСТИ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ РАСТИТЕЛЬНЫХ FDH

Активное развитие методов мегасеквенирования привело к тому, что практически каждый день публикуется структура генома различных организмов, включая растения. Поиск в базах данных GenBank (GB), EMBL, а также KEGG (<http://www.genome.jp/>) позволил найти нуклеотидные последовательности генов (полные или в виде кДНК) растительных FDH более чем из 70 источников. Кроме того, ряд последовательностей, отсутствующих в банках данных, представлен в работе [11]. В табл. 1 приведены названия растений, а также сокращенные обозначения FDH. При сравнении использовали FDH, характерные для различных микроорганизмов, например, ферменты мезофильных бактерий *Pseudomonas* sp. 101 (наиболее изученная к настоящему времени FDH) и *Moraxella* sp. C2, патогенных *Burkholderia stabilis* и *Bordetella bronchiseptica* RB50 (*Alcaligenes bronchisepticus*), глубоководных некультивируемых морских альфа-протеобактерий и азотфиксирующих бактерий *Sinorhizobium meliloti*, дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Candida boidinii*.

Таблица 1. Источники и сокращенные обозначения форматдегидрогеназ, рассмотренных в данной работе

Организм		FDH	Источник данных
Латинское название	Русское название		
РАСТЕНИЯ			
<i>Antirrhinum majus</i>	Львиный зев	AmaFDH1	KEGG: EST 2545
<i>Aquilegia formosa x Aquilegia pubescens</i>	Лютик	ApuFDH1	KEGG: EST 273
		ApuFDH2	[11]
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Резуховидка Таля	AthFDH	EMBL AF208029
<i>Brachypodium distachyon</i>	Коротконожка	BdiFDH1	[11]
<i>Brassica napus</i>	Рапс	BnaFDH1	[11]
		BnaFDH2	KEGG: EST 21261
<i>Brassica oleracea</i>	Капуста	BolFDH1	[11]
<i>Cryptomeria japonica</i>	Японский кедр	CjaFDH1	KEGG: EST 5066
<i>Carica papaya</i>	Папайя	CpaFDH1	KEGG: EST 3924
<i>Citrus reticulata</i>	Мандарин	CreFDH3	KEGG: EST 11052
<i>Citrus sinensis</i>	Апельсин	CsiFDH1	[11]
<i>Coffea canephora</i>	Кофе	CcaFDH1	KEGG: EST 1007
<i>Festuca arundinacea</i>	Овсяница тростниковая	FarFDH1	KEGG: EST 5855
<i>Glycine max</i>	Соя	SoyFDH1	GB AK244764, [38]
		SoyFDH2	GB BT094321
		SoyFDH3	GB AK243932, [38]
		SoyFDH4	GB BT095613
		SoyFDH5	KEGG: EST 19520
<i>Gossypium arboreum</i>	Хлопчатник	GarFDH1	KEGG: EST 1085
<i>Gossypium hirsutum</i>	Хлопчатник	GhiFDH1	KEGG: EST 19680
<i>Gossypium raimondii</i>	Хлопчатник	GraFDH1	KEGG: EST 213
<i>Helianthus annuus</i>	Подсолнечник	HanFDH1	[11]
<i>Hordeum vulgare</i>	Ячмень обыкновенный	HvuFDH1	GB D88272, [8]
<i>Ipomoea batatas</i>	Батат	IbaFDH	EMBL BM878811
<i>Lactuca saligna</i>	Латук солончаковый	LsaFDH1	KEGG: EST 1616
<i>Lotus japonicus</i>	Лядвенец	LjaFDH1	GB FM865900, [10]
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Томат	LesFDH1	GB AJ849378
<i>Malus domestica</i>	Яблоня	MdoFDH	EMBL CN496368
<i>Manihot esculenta</i>	Маниок съедобный, кассава	MesFDH1	KEGG: EST 2788
<i>Medicago truncatula</i>	Люцерна трункатула	MtrFDH1	KEGG: EST 1503
<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	Ледяник, хрустальная трава	McrFDH	GB BE035085
<i>Nicotiana tabacum</i>	Табак	NtaFDH1	[11]
<i>Oryza sativa Japonica group</i>	Рис японский	OsaFDH_Ja	GB AK065872, [39]
<i>Oryza sativa indica cultivar-group</i>	Рис индийский	OsaFDH_In	GB CT832868, [40]
<i>Oryza sativa</i>	Рис	OsaFDH1	AB019533, [41]
<i>Panicum virgatum</i>	Просо	PviFDH1	KEGG: EST 8602
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Фасоль обыкновенная	PvuFDH1	GB ACZ74695, [42]
<i>Phyllostachys edulis</i>	Бамбук	PedFDH	GB FP093692
<i>Physcomitrella patens</i>	Мох Фискомитрелла раскрытая	PpaFDH	GB XM001768721, [43]
<i>Picea glauca</i>	Ель сизая	PglFDH1	KEGG: EST 2327
<i>Picea sitchensis</i>	Ель ситхинская	PsiFDH	GB EF085163, [44]
<i>Pinus pinaster</i>	Сосна приморская	PpiFDH1	KEGG: EST 174

ОБЗОРЫ

<i>Pinus taeda</i>	Сосна ладанная	PtaFDH1	[11]
		PtaFDH2	KEGG: EST 2972
		PtaFDH3	KEGG: EST 15504
<i>Populus nigra</i>	Тополь черный	PniFDH2	KEGG: EST 7989
<i>Populus tremula</i>	Осина	PtmFDH1	KEGG: EST 4757
<i>Populus trichocarpa</i>	Тополь волосистоплодный	PtrFDH1	GB XM002320465, [45]
<i>Prunus persica</i>	Персик	PpeFDH1	KEGG: EST 4281
<i>Quercus robur</i>	Дуб черешчатый	QroFDH1	GB AJ577266.2, [35]
<i>Raphanus raphanistrum</i> subsp. <i>raphanistrum</i>	Редька дикая	RraFDH1	KEGG: EST 15157
<i>Ricinus communis</i>	Клещевина	RcoFDH1	GB XM_002517292
<i>Saccharum officinarum</i>	Сахарный тростник	SofFDH1	KEGG: EST 18227
<i>Solanum tuberosum</i>	Картофель	StuFDH1	GB Z21493, [21]
<i>Sorghum bicolor</i>	Сорго	SbiFDH1	GB XM002438363, [46]
		SbiFDH2	GB XM002454363, [46]
<i>Taraxacum officinale</i>	Одуванчик обыкновенный	TofFDH1	[11]
<i>Theobroma cacao</i>	Какао	TcaFDH1	KEGG: EST 10274
<i>Triphysaria pusilla</i>	Карликовый совиный клевер	TpuFDH1	KEGG: EST 5550
<i>Triticum aestivum</i>	Мягкая пшеница	TaeFDH1	GB AK332605, [47]
<i>Vigna unguiculata</i>	Коровий горох	VunFDH1	KEGG: EST 6491
<i>Vitis vinifera</i>	Виноград	VviFDH1	GB XM002278408
<i>Yucca filamentosa</i>	Юкка	YfiFDH1	[11]
<i>Zea mays</i>	Кукуруза	ZmaFDH	GB EU967680, [48]
<i>Zingiber officinale</i>	Имбирь	ZofFDH1	KEGG: EST 5316
МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ГРИБЫ			
<i>Aspergillus oryzae</i>	Аспергилл, плесневый гриб	AorFDH1	NCBI XM001827498
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	Плесневый гриб	MgrFDH	GB AW180713 180985 180259 180189 180073
<i>Penicillium marneffei</i>	Плесневый гриб	PmaFDH1	GB XM002153251
<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Патогенный гриб	AjcFDH1	[49]
		AjcFDH3	
ДРОЖЖИ			
<i>Candida boidinii</i>	Метилотрофные	CboFDH	EMBL AF004096
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Пекарские	SceFDH	EMBL Z75296
БАКТЕРИИ			
<i>Pseudomonas</i> sp. 101	Метилотрофные	PseFDH	[50]
<i>Moraxella</i> sp.	Метилотрофные	MorFDH	EMBL Y13245
<i>Burkholderia stabilis</i>	Патогенные	BstFDH	[51]
<i>Bordetella bronchiseptica</i> RB50 (<i>Alcaligenes bronchisepticus</i>)	Патогенные	BbrFDH	EMBL BX640441
Uncultured marine alpha proteobacterium HOT2C01 cosmid clone	Некультивируемые глубоководные морские альфа-протеобактерии	UmaFDH	GB AY372455
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Азотфиксирующие	SmeFDH	GB AE006469, [52]

BdiFDH1	-----MAMWRAAAARQLVDRALVGSRAAHTSAG-SKKIVGVF
PedFDH	-----MAMWRAAAARQLVDRALGSRRAAHTSAG-SKKIVGVF
FarFDH1	-----MWRAAAARHLVDRALGSRRAAHTSAG-SKKIVGVF
HvuFDH1	-----MAAMWRAAAARQLVDRVAGSRAAHTSAG-SKKIVGVF
TaeFDH1	-----MAAMCRAAAARQLVDRVAGSRAAHTSAG-SKKIVGVF
SbiFDH1	-----MAMWRAAAARQLVDRALGSSAAHTSAG-SKKIVGVF
SofFDH1	-----MAMWRAAAARQLVDRALGSRRAAHTSAG-SKKIVGVF
ZmaFDH	-----MAMWRAAAARQLVDRALGSRRAAHTSTG-SKKIVGVF
PviFDH1	-----MAMWRAAAARQLVDRALGARAHTSAG-SKKIVGVF
OsaFDH1	-----MAMWRAAAAGHLLGRALGSRRAAHTSAG-SKKIVGVF
SbiFDH2	-----MAMRRAAQAAARFAMGPHVPTAPAAARSLHASAG-SKKIVGVF
LjaFDH1	-----MAMKRAASSAVRSLLTAPTNPSSSIFSRNLHASGG-KKKIVGVF
MtrFDH1	-----MAMKRAASTLITASSKISSLSPPSSITTRDLHASGG-KKKIVGVF
PvuFDH1	-----MAMKRAAASSAFRSLSSSTFSRNLH-----KKKIVGVF
VunFDH1	-----MAMRRAAGSSAIRSLFSSSTFSRNLHVSAGE-KKKIVGVF
SoyFDH3	-----MAMMKRAASSSVRSLSSSSSTFTRNHLHASGE-KKKIVGVF
SoyFDH4	-----MAMMKRAASSALRSLSSSTFTRNHLHASGE-KKKIVGVF
SoyFDH1	-----MSNFTLKMSDPTLAQOHLVKVHTTTHETVVTTHNNHQTPSINASGE-KKKIVGVF
SoyFDH2	-----MLNFTLKMSDPTLAQPHLVKHTT-LETVVTTHNNHNRPSINASGE-KKKIVGVF
SoyFDH5	-----MAMKRAVQSLSSSTFTRNHLHASAG-KKKIVGVF
TofFDH1	-----MAIAMKRAAAAATRAISSANSISIFTRHLHASGG-KKKIVGVF
LsaFDH1	-----MAIAMKSDSGSILTRHLHASGG-KKKIVGVF
HanFDH1	-----MAMSMAMKRSAAAATRALSSATSSSILTRDLHASGG-KKKIVGVF
AmaFDH1	-----MAMKRAAVTAVRALTSSAPSSVLTGRGLHASPG-SKKIVGVF
TpuFDH1	-----MAMKRAVASTVGAITSSGNPASSVLARYLHASPG-SKKIVGVF
LesFDH1	-----MAMRRVASTAARAIASPSLVTRELOQASPG-PKKIVGVF
StuFDH1	-----MAMSRVASTAARAITSPSSLVTRELOQASPG-PKKIVGVF
NtaFDH1	-----MAMRRVASTAARAFASSSPSSLVTRELOQASPG-SKKIVGVF
VviFDH1	-----MAMMKRVAESAVRAFALGTSSTLTKRLHASAG-SKKIVGVF
MesFDH1	-----MKRAATSARAFPSFSGISGSSALGRHLHASAG-SKKIVGVF
GraFDH1	-----MKQVANSAIKAIANSNGSSSLLTRQLHASPG-SKKIVGVF
GarFDH1	-----MKQVANSAIKAIANSNGSSSLLTRQLHASPG-SKKIVGVF
GhiFDH1	-----MKQVANSAIKAIANSNGSSSLLTRQLHASPG-SKKIVGVF
TcaFDH1	-----MKQVASSAIKALANSNGSSSLLTRQLHASPG-SKKIVGVF
CcaFDH1	-----MAMKRVAASALRAFTSSGNSTSSSLLTRQLHASPG-SKKIVGVF
IbaFDH	-----MAMRRVAASGLRAFASYGNPS--LLTRQLHASPG-SKKIVGVF
ApuFDH1	-----MATRKAVVLGAQSLLRSSSTSSPSIRNLHASSE-SKKIVGVF
ApuFDH2	-----MKKAALSTVQSVLSSSSSFTSTRLVRRHSHTSPG-SKKIVGVF
YfiFDH1	-----MAMLRRAAKQAIQTLGSRIPSSSSTFSRHLHASPG-SKKIVGVF
ZofFDH1	-----MAMLRRAAKHAMRALGSRAPDASPFAARMLHASTG-SKKIVGVF
QroFDH1	-----MAGAATSIAIKSVLTRQLHASPG-SKKIVGVF
RcoFDH1	-----MKSYSKRIALWLQRIEDGASDVTEELGVTSINASAG-SKKIVGVF
BnaFDH2	-----MAMRRVTRAAIRASCVSSSSSGYFARKFNASSGDSKKIVGVF
BolFDH1	-----MAMRRVIRASCVSSSSSTGYLARKFHASSGDSKKIVGVF
CsiFDH1	-----MAMKRVASSAINAFASSGYLRSRFRSRHY-ASSG-RKKIVGVF
MdoFDH	-----MASKGVIASAVRALASSGSSASSTFTTRHLHASGG-SKKIVGVF
PpeFDH1	-----MKGVIASAVRTLASSGSSASSTFTTRHLHASAG-SKKIVGVF
CpaFDH1	-----MKRAATSAIKAFASQTSFSGLSLTFARNHLHASPG-SKKIVGVF
CreFDH3	-----MKRVASSAINAFASSGYLRSRFRSRHY-ASSG-SKKIVGVF
BnaFDH1	-----MAMRRTGAIASCVSSSSSTGYLARKFHASSGDSKKIVGVF
AthFDH	-----MAMRQAAKATIRACSSSSSSTGYLARKFHASSGDSKKIVGVF
RraFDH1	-----MAMQAAIRACVSNSSSSTGYLARKFHASSGDSKKIVGVF
PpiFDH1	-----MASRRVISAFAAASRRPICSPVSSSSTGYLARKFHASSGDSKKIVGVF
PtaFDH2	-----MASRRSVISAFAAASRRPICSPVSSSSTGYLARKFHASSGDSKKIVGVF
PtaFDH3	-----MASKRAVISAFAAASRRPICSPVSSSSTGYLARKFHASSGDSKKIVGVF
PtaFDH1	-----MASRRSVISAFAAASRRPICSPVSSSSTGYLARKFHASSGDSKKIVGVF
PsiFDH	-----MASKRAVISTFRAASRKPIFSSVPLASSVRELHAPAG-SNKIVGVF
PglFDH1	-----MASKRAVISTFRAASRRPICSSVPLASSVRELHAPAG-SNKIVGVF
CjaFDH1	-----MASKRAVKS-----AAQ-----AFSPL-SSIRALHAPAG-PNKIVGVF
PtrFDH1	-----MAMKRAATSARAFSSSSPASSVSSGSSSTRLLHASAE-SKKIVGVF
PtmFDH1	-----MAMKRAATSARAFSSSSPASSVSSGSSSTRLLHASAE-SKKIVGVF
PniFDH2	-----MAMKRAATSARAFSSSSPASSVSSGSSSTRLLHASAE-SKKIVGVF
McrFDH	-----MKRATASAIRAMVASSSTNSSTILSRNLHASD-SKKIVGVF
AcrFDH1	-----MTFARSITRAALKASPLSRASRTFSSSSSAQS KVLMVL
MgrFDH	-----MVFARSSLRMARPASSLLSQRATASFTRGANLARAGGVRTLTSTSSRQ GKVLVL
PmaFDH1	-----MVFSRSPRALQRPATSLLAIPARQWRAPVFSV RTLTASAPRQKVLMVL
AjcfFDH3	-----MGRGLPRSSSAPFPQYNTQSYGLPLRPLSLTRVITLTASPKLQ GKVLVL
AjcfFDH1	-----MGRGLPRSSSAPFPQYNTQSYGLPLRPLSLTRVITLTASPKLQ GKVLVL
PseFDH	-----MAKVL CVL

Рис. 1. Сигнальные последовательности растительных формиатдегидрогеназ. Здесь и на рис. 2 и 3 обозначения ферментов см. в табл. 1. Названия ферментов из растений выделены зеленым, из микроскопических грибов – розовым, а FDH из бактерий – синим. Подчеркнуты потенциальные специфические последовательности, обеспечивающие транспорт фермента в митохондрии. Остаток, после которого происходит отщепление сигнального пептида, показан зеленым курсивом. Красным выделены консервативные аминокислотные остатки для всех формиатдегидрогеназ.

Отличительной чертой растительных FDH является наличие на N-конце синтезируемого профермента сигнального пептида, который отвечает за транспорт FDH из цитоплазмы в митохондрии [21]. У бактериальных и дрожжевых FDH сигнальные пептиды отсутствуют. Гены FDH ряда патогенных микроскопических грибов также содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальный пептид. Однако в зависимости от состояния клетки хозяина синтезируемая с гена FDH РНК подвергается альтернативному сплайсингу, в результате которого образуются разные мРНК, кодирующие белок как с сигнальным пептидом, так и без него [49].

На рис. 1 представлены сигнальные последовательности формиатдегидрогеназ из различных источников. Подчеркнуты потенциальные специфические последовательности, обеспечивающие транспорт фермента в митохондрии. Остаток, после которого происходит отщепление сигнального пептида, показан зеленым курсивом. У большинства формиатдегидрогеназ это остаток аргинина, в этом положении находятся также остаток серина (FDH сорго SbiFDH1, клещевины RcoFDH1), лизина (виноград VviFDH1), пролина (FDH сои SoyFDH1, SoyFDH2, изоформы 1, 2). Сигнальная последовательность FDH обогащена аминокислотными остатками, содержащими гидроксильные или положительно заряженные группы, и способна образовывать амфифильную α -спираль. Сигнальная последовательность очень консервативна: удаление всего двух N-концевых аминокислот полностью блокирует транспорт фермента в митохондрии [53]. Установлено, что N-концевой мотив MAM позволяет осуществлять быстрый транспорт фермента в митохондрии. На рис. 1 представлены N-концевые последовательности 63 растительных FDH, из них мотив MAM в положении 1–3 имеют 35 ферментов. У ряда растительных FDH на N-конце находятся

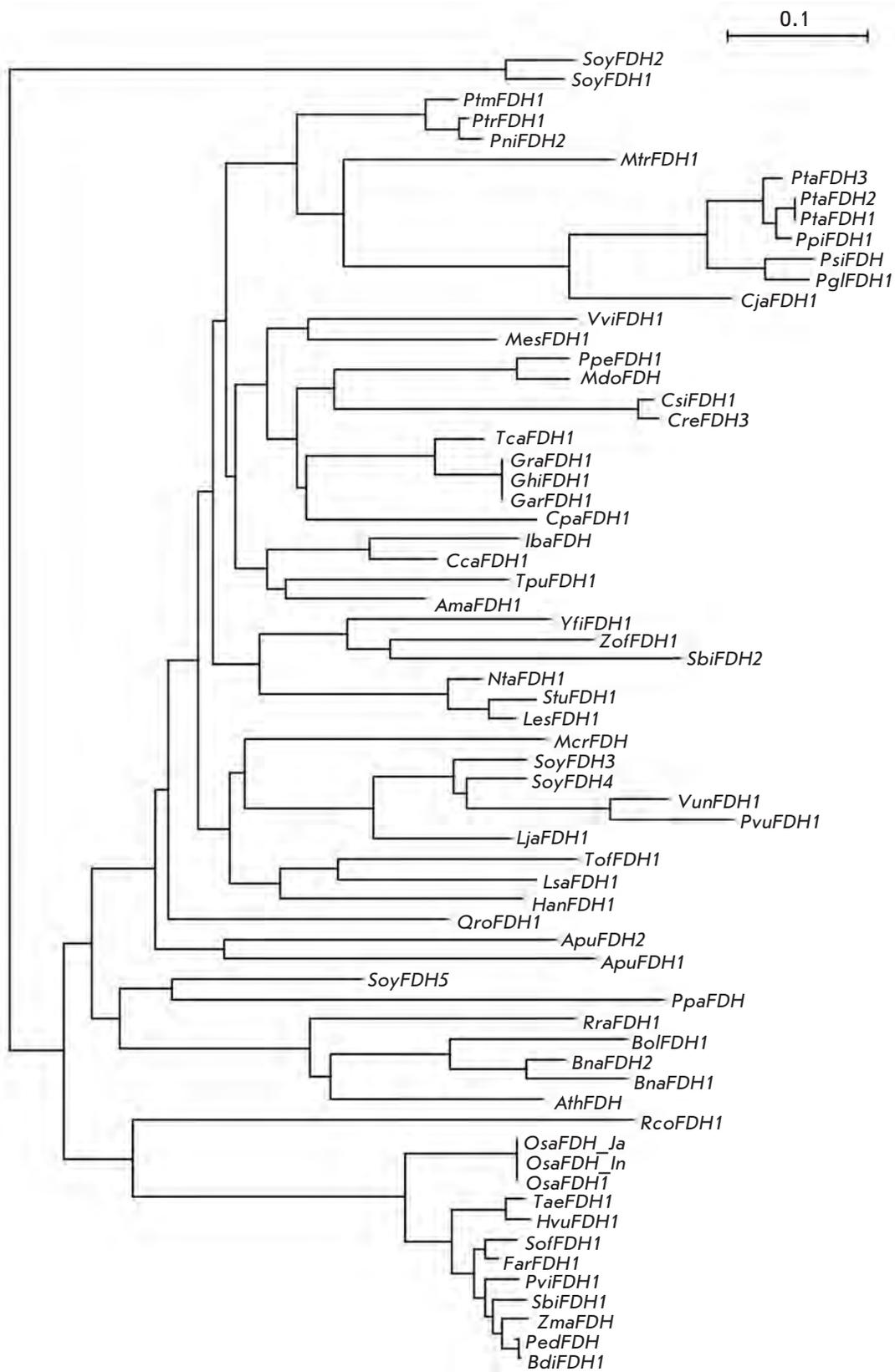


Рис. 2. Филогенетическое дерево N-концевых последовательностей FDH растений.

сходные мотивы: МААМ (у двух) и MAS (у восьми). N-Концевые аминокислотные последовательности изоферментов 1 и 2 FDH сои резко отличаются от последовательностей других растительных формиатдегидрогеназ как по составу (начинается с MSN и MLN), так и по размеру, что говорит о возможной специфической функции этих изоформ FDH. На рис. 1 представлены также N-концевые последовательности FDH грибов *Aspergillus oryzae*, *As. flavus*, *Penicillium marneffeii*, *Mycosphaerella graminicola*, *Ajellomyces capsulatus* (названия отмечены розовым). Приведены две изоформы фермента из *Aj. capsulatus* (AjcFDH1 и AjcFDH3), образующиеся в результате альтернативного сплайсинга мРНК [49]. Некоторые последовательности содержат также остаток аргинина, по которому может происходить отщепление сигнального пептида (отмечен курсивом и розовым цветом). По-видимому, у микроскопических грибов существует аналогичный механизм транспорта FDH в различные органеллы клетки. Красным на рис. 1 выделены полностью консервативные во всех формиатдегидрогеназах остатки Lys и Val. Для сравнения показана N-концевая последовательность формиатдегидрогеназы из *Pseudomonas* sp. 101, высокоомологичная N-концевой области AjcFDH3 без сигнального пептида. Из рис. 1 видно, что последовательности сигнальных пептидов в ферментах из растений одного семейства (пасленые: томаты, картофель; злаки: рис, ячмень, рожь и др.) имеют высокую степень гомологии.

У большинства растений FDH находится в митохондриях, но детальное изучение сигнального пептида фермента из *A. thaliana* показало, что фермент может транспортироваться и в хлоропласты. N-Концевая часть этого фермента сильно отличается от сигнальных последовательностей FDH из картофеля,

Рис. 3. Сравнение последовательностей формиатдегидрогеназ из различных источников. Расшифровку обозначений ферментов см. в табл. 1. Названия ферментов из растений выделены зеленым, а FDH из бактерий – синим. Подчеркиванием выделены потенциальные специфические последовательности, обеспечивающие транспорт фермента в митохондрии. Нумерация остатков приведена согласно последовательности FDH из *Pseudomonas* sp. 101 (*PseFDH*). Звездочкой и красным отмечены консервативные аминокислотные остатки.

FarFDH1	---MWRRAARHLVDRLALGSAANTHAG--SKKIVGVF YKANeya
HuFDH1	---MAAMWRAARQLVDRAVGSAAHTSAG--SKKIVGVF YOAGEYA
TaeFDH1	---MAAMCRRAARQLVDRAVGSAAHTSAG--SKKIVGVF YOAGEYA
ZnaFDH1	---MAMWRAARQLVDRAVGSAAHTSAG--SKKIVGVF YKAGEYA
OseFDH1	---MAMWRAAHLGRLALGSAANTHAG--SKKIVGVF YKAGEYA
SbiFDH2	---MAMRRAAQAAAFAMGPHVHTAPALSLHNASG--SKKIVGVF YKAGEYA
LjFDH1	---MAMKRAASAVSLLTAPHTNPSSTIFSNLHNASG--KKIVGVF YKANeya
SoyFDH2	---MAMKRAASSVRSLLSSSTFTNLHNASG--KKIVGVF YKANEYA
SoyFDH3	---MANTFLKMSDFTLAQLVKVHT--LETVVTHNHRPSINAAGE--KKIVGVF YKANEYA
AnaFDH1	---MAMKRAAVTAVRALTSAPSVLTLGLHNASG--SKKIVGVF YKANeya
TruFDH1	---MAMKRAVATVGAITSGNPASPVLA YLHNASG--SKKIVGVF YKANeya
LesFDH1	---MAMRVAATAARAIAAPSILVFTLEQASG--PKKIVGVF YKANeya
ScuFDH1	---MAMSRVASTAARAITSLSLFTLEQASG--PKKIVGVF YKANeya
VviFDH1	---MAMKRVASAVRALGSPSTGALTLHLHNASG--SKKIVGVF YKANeya
GhiFDH1	---MKOVANSALKAIVANSGLSLLEHLHNASG--SKKIVGVF YKANeyF
TcaFDH1	---MKOVASSALKALANSGLSSVLLLEHLHNASG--SKKIVGVF YKANeya
CsaFDH1	---MAMKRVASNLPAFTSNGNSSLLEHLHNASG--SKKIVGVF YKANeya
ApuFDH1	---MATRKAVVLGAGSLRSTSSPSLEHLHNASG--SKKIVGVF YKANeya
ZoFDH1	---MAMRRAAMRALGRAPAPSPALHLHNASG--SKKIVGVF YKANeya
QcFDH1	---MAGAATSAIKSVLTLHLHNASG--SKKIVGVF YKANeya
RcFDH1	---MKS YKRIALMQRLEDGASDVTLEGVINSASAG--SKKIVGVF YKANeya
BnaFDH2	---MAMRVTRAAIRASCVSSSSGYLAKFNASGSDSKKIVGVF YKANeya
Bo1FDH1	---MAMRRVTRASCVSSSTGYLAKFNASGSDSKKIVGVF YKANeya
MoFDH1	---MAKGVILASAVRALASSGASSTFTLHLHNASG--SKKIVGVF YKANeya
PpeFDH1	---MKGVILASAVRALASSGASSTFTLHLHNASG--SKKIVGVF YKANeya
CpaFDH1	---MKRAATSAIKAFASOTFSGLSTNFA NLHNASG--SKKIVGVF YKANeya
AtcFDH1	---MAMROAKATIRACSSSSSGYPAIFOFNASGSDSKKIVGVF YKANeya
PriFDH1	---MASREAVLISA FRAASRPICSPVSLA YLHNASG--SKKIVGVF YKANeya
PaFDH2	---MASRSVLSAFRAASRPICSPVSLA YLHNASG--SKKIVGVF YKANeya
PsiFDH1	---MAKRAVLSIFRAASRPICSPVSLASSYELHNASG--SKKIVGVF YKANeya
PtFDH1	---MAMKRAATSAIRAFSSPSLSSGSSLEHLHNASG--SKKIVGVF YKANeya
MgFDH1	---VFAKSLRMAPASSLLSORATAFTORGANLARAGGVTLTSSRSQVLLVLDGHEHA
Aj3FDH1	---KLVLVLYDAGKHA
CoFDH1	---SKKVLVLYEGEKHA
ScFDH1	---AKVVCVLYDFPDVGVYPPHYVVDTLVITRYADQATPAPAGPFGFVGLVSGALGKYLEAEGHCHLVTSDKDG--PDSFEFRLPDAVVISQFPFPA Y-LTAER
Be1FDH1	---AKLVCLVLYDDPVGGMETAYRDSLPALARYPGGATLPTPKALDF--TGHLLCCVSGELGKLFKLEADAGHLLVTVNDKDG--PGCVFEBELPDADVVISQFPFPA Y-LTAER
Be2FDH1	---AKLVCLVLYDDPVGGMETAYRDSLPALARYPGGATLPTPKALDF--TGHLLCCVSGELGKLFKLEADAGHLLVTVNDKDG--PGCVFEBELPDADVVISQFPFPA Y-LTAER
UnaFDH1	---EMAKVA CVLYDDPVGUYTAYARDGLPTLERYPGQTLPTPKALDF--TFCQVLLCSVSGELGKLFKLEADAGHLLVTVNDKDG--PDSVFEFELVDADVVISQFPFPA Y-LTAER
SneFDH1	---
PseFDH1	---

ячменя и риса. Предполагается, что при некоторых условиях AthFDH, локализованная в хлоропластах, может катализировать обратную реакцию, т.е. превращение углекислого газа в формиат [27]. Использование другого алгоритма для сравнения сигнальных пептидов FDH показало, что все ферменты, кроме FDH из растений томата, могут транспортироваться как в митохондрии, так и в хлоропласты [28]. Анализ сигнальных последовательностей, проведенный с помощью программ Predotar, TargetP и Mitoprot [11], подтвердил, что FDH локализуется преимущественно в митохондриях.

В растениях формиатдегидрогеназа часто представлена несколькими изоформами, или изоферментами, синтез которых определяется состоянием растения. Различия в изоферментном составе FDH в здоровых и больных пальмах *Pericopsis mooniana* используют для отбора деревьев при выборочной вырубке [54]. Полиморфизм характерен и для FDH из миндаля *Prunus dulcis* [55] или *P. amygdalus* [56]. На основании анализа изоформ FDH и нескольких других дегидрогеназ предложен метод идентификации генотипа растения. Как уже отмечалось выше, причиной образования различных изоформ FDH может быть фосфорилирование [34]. В зависимости от степени модификации наблюдалось образование многочисленных форм фермента с *pI* от 6.75 до 7.19. Кроме того, установлено, что дополнительные изоформы FDH картофеля возникают в результате посттрансляционного деамидирования остатков Asn329 и Gln330 [34].

В отличие от самих растительных FDH, уровень гомологии между которыми составляет около 80%, различия в последовательностях сигнальных пептидов гораздо более выражены. Особенно наглядно это видно в случае изоферментов FDH сои. Гомология последовательностей самих изоферментов составляет 98%, в то время как у сигнальных последовательностей не достигает и 40%. На рис. 2 представлено филогенетическое дерево сигнальных пептидов растительных FDH. Видно, что два изофермента FDH сои *Glycine max* – SoyFDH1 и SoyFDH2, образуют отдельную группу. N-Концевая область этих ферментов гораздо длиннее, чем у FDH из других растений (рис. 1), и сильно отличается по аминокислотному составу. Далее от дерева отделилась большая группа семейства злаков. Это ферменты риса (OsFDH), пшеницы (TaeFDH), ячменя (HvuFDH), сахарного тростника, бамбука и других. Большая группа представлена ферментами растений семейства капустных (крестоцветных): редьки (RraFDH), капусты (VolFDH), рапса (BnaFDH), а также *A. thaliana* (AthFDH). Другие группы образуют белки астровых, бобовых, пасленовых, мальвовых, сосновых и иво-

вых. Как уже отмечалось выше, пять изоферментов FDH сои не образуют отдельную группу. Поскольку сигнальный пептид отвечает прежде всего за транспорт фермента внутри клетки, можно предположить, что разные изоферменты FDH сои транспортируются в разные органеллы.

На рис. 3 представлено выравнивание некоторых известных на настоящий момент полных последовательностей растительных FDH, для сравнения приведены также последовательности ряда аналогичных ферментов микроорганизмов. Абсолютно консервативные участки выделены красным, остатки, повторяющиеся только в растительных FDH, отмечены зеленым. Важное отличие бактериальных ферментов от растительных состоит в наличии жесткой N-концевой петли. Этот участок покрывает значительную часть субъединицы фермента. Вероятно, его взаимодействие с другими аминокислотными остатками является причиной более высокой термостабильности бактериальных ферментов по сравнению с растительными. Кроме того, у FDH микробного происхождения C-концевая область длиннее, чем у ферментов растений. В то же время в остальной части аминокислотной последовательности отчетливо прослеживается разделение FDH по гомологии на две группы. В первую входят ферменты бактерий и растений, а во вторую – дрожжей и микроскопических грибов.

Ферменты растений высокогомологичны между собой (около 80%), гомология между бактериальными и растительными FDH составляет около 50%.

ПОЛУЧЕНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗ

В растениях FDH локализованы в митохондриях, поэтому они составляют малую часть всех растворимых белков клетки, и выделение фермента непосредственно из растений представляет трудоемкую и длительную процедуру. Как правило, растительные FDH не отличаются высокой стабильностью, что приводит к достаточно существенной инактивации фермента в процессе выделения. В результате удельная активность полученных препаратов FDH намного ниже, чем можно было ожидать (табл. 2). Впервые очищенная растительная FDH была получена в 1951 г. из гороха и фасоли [13]. В 1983 г. в достаточных количествах FDH выделили из бобов сои *G. max*, что позволило определить аминокислотный состав растительной формиатдегидрогеназы [57].

Первую кДНК растительной FDH клонировали из картофеля в 1993 г. [21]. В 1998 г. клонировали кДНК FDH из ячменя [8], а в 2000 г. – из риса [41] и *A. thaliana* [26, 27]. Созданы трансгенные растения *A. thaliana* и табака, экспрессирующие AthFDH

[28], однако выход фермента был не очень высоким. Экспрессия полноразмерной кДНК FDH картофеля в клетках *Escherichia coli* приводила к образованию нерастворимых телец включения [21].

Впервые активную и растворимую рекомбинантную растительную формиадегидрогеназу получили в клетках *E. coli*, в которых экспрессировали кДНК FDH риса [41], однако уровень белка был очень низким – около 0.01% от всех растворимых белков клетки. В нашей лаборатории созданы штаммы *E. coli* – суперпродуценты активных FDH из *A. thaliana* (AthFDH) и сои *G. max* (изофермент SoyFDH2), в которых содержание фермента достигало 40% от всех растворимых белков клетки [58] (ген FDH сои любезно предоставлен профессором Н. Лабру (N. Labrou) из Афинского сельскохозяйственного университета, Греция, а ген FDH *A. thaliana* – профессором Дж. Марквеллом (J. Markwell) из Университета штата Небраска в Линкольне, США). В клетках *E. coli* отсутствует система транспорта в митохондрии, поэтому, чтобы получить «природный» фермент нам пришлось удалить из кДНК последовательности, кодирующие сигнальный пептид [58]. После оптимизации условий культивирования выход рекомбинантных FDH *A. thaliana* и сои *G. max* достигал 500–600 мг/л среды [6]. Разработана методика, которая за одну хроматографическую стадию позволяла получать несколько сотен миллиграмм гомогенного препарата FDH за одно выделение. Таким образом, были созданы все условия для проведения систематических исследований FDH из *A. thaliana* и сои *G. max*, включая эксперименты по генетической инженерии и определению структуры с помощью рентгеноструктурного анализа. Успешно проведены и эксперименты по экспрессии в клетках *E. coli* FDH из *L. japonicus* [10].

КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФОРМИАДЕГИДРОГЕНАЗ РАСТЕНИЙ

В табл. 2 суммированы кинетические свойства природных и рекомбинантных растительных FDH. Для сравнения приведены характеристики наиболее изученных бактериальных и дрожжевых ферментов. Из данных, приведенных в табл. 2, можно сделать несколько важных выводов:

1. На примере FDH из *A. thaliana* хорошо видно, что многостадийное выделение природного фермента сопровождается значительной потерей активности. Удельная активность препаратов, даже полученных из трансгенных растений, в несколько раз меньше, чем у рекомбинантной AthFDH, экспрессируемой в клетках *E. coli*. Следует отметить, что AthFDH относится к стабильным FDH. По термостабильности она даже превосходит FDH *Moraxella* sp. C2 и дрож-

жей *C. boidinii* (табл. 3). Очевидно, что степень инактивации других менее стабильных FDH (особенно в случае SoyFDH), выделяемых из природных источников, будет выше. Это необходимо учитывать при анализе формиадегидрогеназной активности в растениях.

2. Удельная активность рекомбинантных AthFDH и SoyFDH сравнима с активностью формиадегидрогеназ микроорганизмов, хотя она уступает FDH метилотрофных бактерий и пекарских дрожжей. Как уже отмечалось выше, в ходе выделения может происходить частичная инактивация ферментов, поэтому расчет каталитической константы на основе величин удельной активности и молекулярной массы может давать заниженные значения k_{cat} . Это особенно важно в случае SoyFDH, термостабильность которой намного ниже, чем у других FDH (см. ниже раздел по термостабильности). Поэтому нами разработана методика определения концентрации активных центров рекомбинантной SoyFDH, основанная на тушении собственной флуоресценции фермента при его титровании азид-ионом в присутствии кофермента NAD^+ [64]. Азид-ион является сильным конкурентным ингибитором SoyFDH ($K_i = 3.6 \times 10^{-7}$ М), поэтому в условиях, обеспечивающих эквимолярное связывание фермента и ингибитора, наблюдается линейная зависимость тушения флуоресценции FDH от концентрации азид-иона. Определенная из этих экспериментов величина k_{cat} фактически совпала с величиной, рассчитанной по удельной активности и молекулярной массе. Полученные данные свидетельствуют, что, несмотря на низкую термостабильность, SoyFDH, выделяемая по разработанной нами методике, не инактивируется. В настоящее время эта методика активно используется для определения величин k_{cat} мутантных форм SoyFDH.

3. Растительные FDH имеют гораздо более низкие значения констант Михаэлиса как по формиадегидрогеназе, так и по коферменту NAD^+ , чем бактериальные и дрожжевые ферменты. Это очень важно для практического применения FDH. В настоящее время рекомбинантные FDH *Pseudomonas* sp. 101 и *C. boidinii*, химическая и температурная стабильность которых улучшены методами белковой инженерии, используются для регенерации восстановленного кофермента ($NADH$ или $NADPH$) в процессах синтеза хиральных соединений с помощью дегидрогеназ [6].

4. Практически все изученные FDH высокоспецифичны по отношению к коферменту NAD^+ . Их каталитическая эффективность в реакции с NAD^+ выше, чем в реакции с $NADP^+$ от 2500 (PseFDH) до 3 миллиардов (SceFDH) раз. Исключение составляет описанная совсем недавно FDH из патогенных бактерий *Burkholderia stabilis*, которая в 26 раз более эффек-

Таблица 2. Кинетические параметры форматдегидрогеназ из различных источников

Препарат FDH	Удельная активность, ед./мг	k_{cat} , с ⁻¹	K_M (NAD ⁺), мкМ	K_M (формат), мМ	K_M (NADP ⁺), мМ	$\frac{k_{cat}^{NADP^+}}{K_M^{NADP^+}}$ / $\frac{k_{cat}^{NAD^+}}{K_M^{NAD^+}}$	Ссылка
<i>Arabidopsis thaliana</i> , нативная, после аффинной хроматографии	нд*	нд	65	10	нд	нд	[27]
<i>A. thaliana</i> , нативная, из митохондрий	нд	нд	76	11	нд	нд	[59]
<i>A. thaliana</i> , рекомбинантная из трансгенного табака	1.3	0.87	78	11	нд	нд	[59]
<i>A. thaliana</i> , рекомбинантная из трансгенного табака + термообработка 5 мин при 60°C	0.1	0.07	35	3.3	нд	нд	[59]
<i>A. thaliana</i> , из митохондрий листьев	1.9	1.27	34	1.4	нд	нд	[60]
<i>A. thaliana</i> , рекомбинантная из <i>E. coli</i>	6.5	3.8	20	2.8	10	5.0×10^{-5}	[58]
Горох (семена) <i>Pisum sativum</i>	нд	нд	22	2 [61] 1.67; 6.25 [62]	нд	нд	[61, 62]
Бобы Маш, <i>Phaseolus aureus</i> , нативная	нд	нд	7.2	1.6	нд	нд	[63]
Соя, <i>Glycine max</i> , нативная	нд	нд	5.7	0.6	нд	нд	[57]
Соя, <i>G. max</i> , рекомбинантная	4.0	2.83 [64]	13.2	1.5	1	8.7×10^{-4}	[58, 64, 76]
<i>Lotus japonicus</i>	нд	1.2 (NAD ⁺) 0.005 (NADP ⁺)	25.9	6.1	29.5	3.7×10^{-6}	[10]
Шпинат, <i>Spinacia oleracea l.</i> , из листьев	нд	нд	нд	1.7	нд	нд	[16]
Картофель <i>Solanum tuberosum</i>	нд	нд	19	0.54	нд	нд	[29]
<i>C. boidinii</i> , рекомбинантная, дикого типа	6.3	3.7	37	5.9	нд	нд	[65]
<i>C. metillica</i> , дикого типа	2.1	1.4	55	нд	нд	$< 4 \times 10^{-6}$	[66]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , рекомбинантная	10	6.5	36	5.5	нд	$< 3.3 \times 10^{-10}$	[67, 68]
<i>Burkholderia stabilis</i>	нд	1.66 (NAD ⁺) 4.75 (NADP ⁺)	1430	55.5	0.16	25.9	[51]
<i>Moraxella</i> sp. C2, рекомбинантная	10.0	7.3	80	7.5	нд	нд	[6]
<i>Pseudomonas</i> sp. 101	10.0	7.3	60	7	>200	4.2×10^{-4}	[6]

*нд – нет данных.

тивна в реакции с NADP⁺, чем с NAD⁺ [51]. Отметим, что мутантная PseFDH, коферментная специфичность которой сменилась с NAD⁺ на NADP⁺, получена еще в 1993 г. [6, 68], и такой фермент успешно использовали для регенерации NADPH [69, 70]. Для получения NADP⁺-специфичного фермента очень привлекательной выглядит SoyFDH, которая имеет самое низкое значение K_m по NADP⁺ среди всех NAD⁺-специфичных FDH дикого типа [58] (табл. 2).

ТЕМПЕРАТУРНАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ РАСТИТЕЛЬНЫХ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗ

До получения рекомбинантных AthFDH и SoyFDH в клетках *E. coli* систематические исследования термостабильности растительных FDH не проводили. Согласно [59], после инкубации трансгенной AthFDH в течение 5 мин при 60°C значения K_m по формиату и NAD⁺ снижаются, однако величина удельной активности упала при этом в 13 раз. Нами проведены систематические исследования температурной стабильности рекомбинантных AthFDH и SoyFDH с использованием двух подходов – определения кинетики термоинактивации и дифференциальной сканирующей калориметрии [71, 72]. Оказалось, что термоинактивация растительных FDH, как и их аналогов из бактерий и дрожжей, протекает по мономолекулярному механизму. Зависимости падения активности AthFDH и SoyFDH от времени описываются кинетикой реакции первого порядка, а величина наблюдаемой константы скорости инактивации первого порядка не зависит от концентрации фермента. AthFDH и SoyFDH очень сильно отличаются по тер-

мостабильности. AthFDH теряла 50% активности за 20 мин при 59.5°C, а SoyFDH – при 52.8°C. Разница почти в 7°C соответствует разнице в константах скорости инактивации более чем в 1000 раз. Фактически AthFDH уступает по термостабильности только FDH *Pseudomonas* sp. 101 (63.0°C, самая стабильная FDH из известных) [6] и *Staphylococcus aureus* (62.0°C) и превосходит все остальные известные микробные формиатдегидрогеназы. SoyFDH, наоборот, уступает по стабильности всем известным FDH за исключением фермента из пекарских дрожжей, у которого существует другой механизм инактивации. Зависимости константы скорости инактивации AthFDH и SoyFDH от температуры описываются уравнением теории активированного комплекса. Рассчитанные значения энтальпии ΔH^\ddagger - и энтропии ΔS^\ddagger -активации приведены в табл. 3. Видно, что термостабильность формиатдегидрогеназ хорошо коррелирует со значениями ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger . Наиболее высокие значения характерны для самой стабильной PseFDH, а наиболее низкие – для SoyFDH.

Результаты экспериментов по изучению термостабильности растительных FDH с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии хорошо согласуются с данными по кинетике инактивации. В табл. 3 приведены значения температуры и теплоты фазового перехода. Для всех изученных FDH характерна высокая кооперативность процесса денатурации. PseFDH имеет самое большое значение теплоты плавления, у SoyFDH это значение в 2.5 раза меньше. Температура плавления AthFDH выше, чем у CboFDH и MorFDH.

Таблица 3. Параметры термоинактивации формиатдегидрогеназ из разных источников

Источник FDH	Кинетика термоинактивации*		Дифференциальная сканирующая калориметрия* [72]		
	ΔH^\ddagger , кДж/моль	ΔS^\ddagger , Дж/(моль · град)	C_p , кДж/моль	T_m , °C	$T_{1/2}$, °C
<i>Pseudomonas</i> sp. 101	540 [6]	1320 [6]	2060	67.6	5.4
<i>Moraxella</i> sp. C2	нд**	нд**	1830	63.4	4.9
<i>Candida boidinii</i>	480 [77]	1250 [77]	1730	64.4	5.3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	420 [67]	нд	820	46.4	3.2
<i>Arabidopsis thaliana</i>	490 [6]	1200 [6]	1330	64.9	5.9
<i>Glycine max</i>	370 [76]	860 [76]	820	57.1	7.5

*Все измерения проводили в 0.1 М фосфатном буфере, pH 7.0.

**Нет данных.

В настоящее время нами проводятся эксперименты по повышению термостабильности рекомбинантной SoyFDH методами генной инженерии.

ХИМИЧЕСКАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ РАСТИТЕЛЬНЫХ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗ

FDH активно используется в процессах синтеза оптически активных соединений, катализируемых дегидрогеназами. В этих процессах очень большую роль играет операционная стабильность, т.е. время работы фермента. В условиях биокаталитического процесса инактивация FDH связана или с окислением кислородом, или с химической модификацией сульфгидрильных групп фермента. Операционная стабильность PseFDH и CboFDH была повышена с помощью направленного мутагенеза двух остатков Cys [6, 65]. Как уже отмечалось выше, в растениях синтез FDH усиливается при различных стрессовых воздействиях. В этих же условиях, как правило, в клетке резко возрастает концентрация активных форм кислорода (супероксид-радикалы, пероксид водорода и др.). Следовало ожидать, что для обеспечения высокой активности при стрессе растительные FDH должны быть гораздо более устойчивыми к воздействию таких агентов, чем формиатдегидрогеназы, функционирующие в нестрессовых условиях. Для проверки этой гипотезы изучили кинетику инактивации под действием пероксида водорода рекомбинантных AthFDH, SoyFDH, PseFDH, а также FDH из *S. aureus* дикого типа (SauFDH) и трех мутантных PseFDH, в которых заменили один или два остатка Cys. FDH из *S. aureus* также является белком стресса, поскольку ее биосинтез возрастает в 20 раз

при переходе стафилококков от планктонного роста к образованию биопленок [73]. Оказалось, что скорость инактивации AthFDH и SoyFDH под действием H_2O_2 примерно одинакова, и она в 18 раз ниже, чем у PseFDH дикого типа. В этих же условиях стабильность SauFDH была в 6 раз выше, чем у растительных ферментов [74]. PseFDH с такой же стабильностью, как у SoyFDH, удалось получить только после двойной замены Cys145Ser/Cys255/Ala. Таким образом, показано, что FDH растений и бактерий, синтезируемые при стрессовых воздействиях, действительно обладают более высокой химической стабильностью, чем формиатдегидрогеназы, синтез которых индуцируется другими факторами. Кроме того, изучение термоинактивации формиатдегидрогеназ в присутствии пероксида водорода может использоваться для сравнительной оценки химической стабильности FDH *in vivo*.

СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗ РАСТЕНИЙ

FDH не относится к кристаллографически очень хорошо изученным ферментам. До недавнего времени в банке трехмерных структур белков PDB были депонированы структуры FDH только из трех источников – бактерий *Pseudomonas* sp. 101 и *Moraxella* sp. C2 (свободные ферменты и в тройном комплексе с NAD^+ и азидом) и дрожжей *C. boidinii* (структуры двух мутантных форм апо-фермента). В случае формиатдегидрогеназ свободный фермент находится в «открытой» форме. При образовании тройного комплекса FDH– NAD^+ –азид, структура которого считается аналогом структуры фермента в переход-

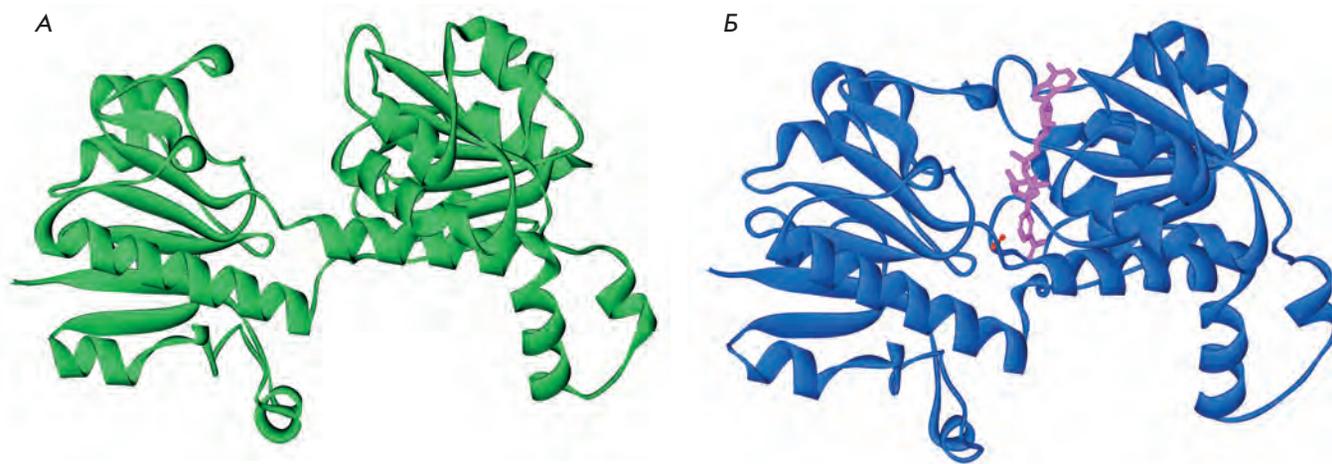


Рис. 4. Структуры апо- (А) и холо- (Б) форм FDH из *A. thaliana*. Рисунки получены с использованием структур 3JTM и 3N7U соответственно. Молекулы NAD^+ и азид-иона показаны в структуре холо-формы маджентой и красным соответственно.

ном состоянии, происходит значительная компактизация белковой глобулы, и FDH переходит в «закрытое» состояние. Разработка высокоэффективной системы экспрессии AthFDH и SoyFDH в клетках *E. coli* позволила приступить к их кристаллизации и определению структуры. В настоящее время решены структуры AthFDH как в открытой, так и в закрытой конформации (3NAQ и 3N7U, разрешение 1.7 и 2 Å соответственно). Для получения структуры AthFDH в открытой конформации с более высоким разрешением (3JTM, 1.3 Å) кристаллы фермента были получены в космосе [75]. На рис. 4 представлены структуры апо- и холо-AthFDH (открытая и закрытая конформации соответственно). Более подробный анализ этих структур будет приведен в отдельных статьях. Как на земле, так и в космосе получены кристаллы только тройного комплекса SoyFDH–NAD⁺–азид FDH сои *G. max*. Структуры этих комплексов определены с разрешением 1.9 Å, готовится их депонирование в банк структур PDB.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Опубликованные и наши собственные данные свидетельствуют, что в растениях FDH играют очень важную роль, особенно при ответе на стрессовые воздействия. Регуляция биосинтеза и физиологическая роль FDH многообразны, сложны и до конца так и не выяснены. Систематическое изучение структуры и функции этих ферментов находится только

в начальной стадии. Результаты таких исследований представляют очень большой интерес для фундаментальной науки, и имеют важное практическое значение. Получение мутантных форм FDH с высокой активностью открывает новый путь к созданию растений с повышенной устойчивостью к неблагоприятным воздействиям, поскольку при таком же уровне экспрессии, как и у FDH дикого типа, более активные мутантные ферменты будут более эффективно снабжать клетку энергией, необходимой для преодоления неблагоприятных последствий стресса. FDH из сои также рассматривается как исключительно перспективная для создания высокоэффективного биокатализатора регенерации NAD(P)H в процессах синтеза оптически активных соединений с помощью дегидрогеназ. Природный фермент отличается высокой операционной стабильностью и среди известных FDH имеет одну из самых низких величин константы Михаэлиса как по NAD⁺, так и по формиату. Однако для практического внедрения SoyFDH необходимо повысить ее каталитическую активность и термостабильность. В этом направлении нами сейчас ведутся активные исследования. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке
Министерства образования и науки РФ
(госконтракт № 16.512.11.2148) и Российского
фонда фундаментальных исследований
(грант № 11-04-00920).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Родионов Ю.В. // Успехи микробиологии. 1982. Т. 16. С. 104–138.
2. Ferry J.G. // FEMS Microbiol. Rev. 1990. V. 7. P. 377–382.
3. Vinals C., Depiereux E., Feytmans E. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1993. V. 192. P. 182–188.
4. Tishkov V.I., Galkin A.G., Egorov A.M. // Biochimie. 1989. V. 71. № 4. P. 551–557.
5. Тишков В.И., Попов В.О. // Биохимия. 2004. Т. 69. С. 1537–1554.
6. Tishkov V.I., Popov V.O. // Biomol. Eng. 2006. V. 23. P. 89–110.
7. Hourton-Cabassa C., Ambard-Bretteville F., Moreau F., Davy de Virville J., Remy R., Colas des Francs-Small C. // Plant Physiol. 1998. V. 116. P. 627–635.
8. Suzuki K., Itai R., Suzuki K., Nakanishi H., Nishizawa N.-K., Yoshimura E., Mori S. // Plant Physiol. 1998. V. 116. P. 725–732.
9. Thompson P., Bowsher C.G., Tobin A.K. // Plant Physiol. 1998. V. 118. P. 1089–1099.
10. Andreadeli A., Flemetakis E., Axarli I., Dimou M., Udvardi M.K., Katinakis P., Labrou N.E. // Biochim. Biophys. Acta. 2009. V. 1794. P. 976–984.
11. David P., Colas des Francs-Small C., Seignac M., Thareau V., Macadre C., Langin T., Geffroy V. // Theor. Appl. Genet. 2010. V. 121. P. 87–103.
12. Thunberg T. // Arch. Physiol. Biochem. 1921. V. 18. P. 601–606.
13. Davison D.C. // Biochem. J. 1951. V. 49. P. 520–526.
14. Davies D.D. // J. Exp. Bot. 1956. V. 7. P. 203–218.
15. Mazelis M. // Plant Physiol. 1960. V. 35. P. 386–391.
16. Halliwell B. // Biochem. J. 1974. V. 138. P. 77–85.
17. Jansch L., Krufft V., Schmitz U.K., Braun H.-P. // Plant J. 1996. V. 9. № 3. P. 357–368.
18. Oliver D.J. // Plant Physiol. 1981. V. 68. P. 703–705.
19. Hanson A.D., Nelsen C.E. // Plant Physiol. 1978. V. 62. P. 305–312.
20. Colas des Francs-Small C., Ambard-Bretteville F., Darpas A., Sallantin M., Huet J.-C., Pernollet J.-C., Remy R. // Plant Physiol. 1992. V. 98. P. 273–278.
21. Colas des Francs-Small C., Ambard-Bretteville F., Small I.D., Remy R. // Plant Physiol. 1993. V. 102. P. 1171–1177.
22. Herbig A., Giritch A., Horstmann C., Becker R., Balzer H.-J., Baumlein H., Stephan U.W. // Plant Physiol. 1996. V. 111. P. 533–540.
23. Dubos C., Plomion C. // Plant Mol. Biol. 2003. V. 51. P. 249–262.
24. Minami A., Nagao M., Arakawa K., Fujikawa S., Takezawa D. // J. Plant Physiol. 2003. V. 160. P. 475–483.
25. Yin L., Lan Y., Zhu L. // Plant Mol. Biol. 2008. V. 68. P. 597–617.
26. Fukusaki E., Ikeda T., Shiraishi T., Nishikawa T., Kobayashi A. // J. Biosci. Bioeng. 2000. V. 90. P. 691–693.
27. Olson B.J., Skavdahl M., Ramberg H., Osterman J.C., Markwell J. // Plant Sci. 2000. V. 159. P. 205–212.

28. Herman P.L., Ramberg H., Baack R.D., Markwell J., Osterman J.C. // *Plant Sci.* 2002. V. 163. P. 1137–1145.
29. Ambard-Bretteville F., Sorin C., Rebeille F., Hourton-Cabassa C., Colas des Francs-Small C. // *Plant Mol. Biol.* 2003. V. 52. P. 1153–1168.
30. Igamberdiev A.U., Bykova N.V., Kleczkowski L.A. // *Plant Physiol. Biochem.* 1999. V. 37. № 7–8. P. 503–513.
31. Li R., Moore M., King J. // *Plant Cell Physiol.* 2003. V. 44. № 3. P. 233–241.
32. Perales M., Eubel H., Heinemeyer J., Colaneri A., Zabaleta E., Braun H.P. // *J. Mol. Biol.* 2005. V. 350. P. 263–277.
33. Bykova N.V., Egsgaard H., Møller I.M. // *FEBS Lett.* 2003. V. 540. P. 141–146.
34. Bykova N.V., Stensballe A., Egsgaard H., Jensen O.N., Møller I.M. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 26021–26030.
35. Kruger A., Peskan-Berghofer T., Frettinger P., Herrmann S., Buscot F., Oelmüller R. // *New Phytol.* 2004. V. 163. P. 149–157.
36. Bruggmann R., Abderhalden O., Reymond P., Dudler R. // *Plant Mol. Biol.* 2005. V. 58. P. 247–267.
37. Giri A.P., Wunsche H., Mitra S., Zavala J.A., Muck A., Svatos A., Baldwin I.T. // *Plant Physiol.* 2006. V. 142. P. 1621–1641.
38. Umezawa T., Sakurai T., Totoki Y., Toyoda A., Seki M., Ishiwata A., Akiyama K., Kurotani A., Yoshida T., Mochida K., et al. // *DNA Res.* 2008. V. 15. P. 333–346.
39. Kikuchi S., Satoh K., Nagata T., Kawagashira N., Doi K., Kishimoto N., Yazaki J., Ishikawa M., Yamada H., Ooka H., et al. // *Science.* 2003. V. 301. P. 376–379.
40. Liu X., Lu T., Yu S., Li Y., Huang Y., Huang T., Zhang L., Zhu J., Zhao Q., Fan D., et al. // *Plant Mol. Biol.* 2007. V. 65. P. 403–415.
41. Shiraishi T., Fukusaki E., Kobayashi A. // *J. Biosci. Bioeng.* 2000. V. 89. P. 241–246.
42. David P., Chen N.W.G., Pedrosa-Harand A., Thareau V., Seignac M., Cannon S.B., Debouck D., Langin T., Geffroy V. // *Plant Physiol.* 2009. V. 151. P. 1048–1065.
43. Rensing S.A., Lang D., Zimmer A.D., Terry A., Salamov A., Shapiro H., Nishiyama T., Perroud P.-F., Lindquist E.A., Kamisugi Y., et al. // *Science.* 2008. V. 319. № 5859. P. 64–69.
44. Ralph S.G., Chun H.J., Kolosova N., Cooper D., Oddy C., Ritland C.E., Kirkpatrick R., Moore R., Barber S., Holt R.A., et al. // *BMC Genomics.* 2008. V. 9. P. 484.
45. Tuskan G.A., Difazio S., Jansson S., Bohlmann J., Grigoriev I., Hellsten U., Putnam N., Ralph S., Rombauts S., Salamov A., et al. // *Science.* 2006. V. 313. P. 1596–1604.
46. Paterson A.H., Bowers J.E., Bruggmann R., Dubchak I., Grimwood J., Gundlach H., Haberler G., Hellsten U., Mitros T., Poliakov A., et al. // *Nature.* 2009. V. 457. № 7229. P. 551–556.
47. Kawaura K., Mochida K., Enju A., Totoki Y., Toyoda A., Sakaki Y., Kai C., Kawai J., Hayashizaki Y., Seki M., et al. // *BMC Genomics.* 2009. V. 10. P. 271.
48. Alexandrov N.N., Brover V.V., Freidin S., Troukhan M.E., Tatarinova T.V., Zhang H., Swaller T.J., Lu Y.P., Bouck J., Flavell R.B., et al. // *Plant Mol. Biol.* 2009. V. 69. P. 179–194.
49. Hwang L., Hocking-Murray D., Bahrami A.K., Andersson M., Rine J., Sil A. // *Mol. Biol. Cell.* 2003. V. 14. P. 2314–2326.
50. Тишков В.И., Галкин А.Г., Егоров А.М. // *Докл. АН СССР.* 1991. Т. 317. С. 745–748.
51. Hatrongjit R., Packdibamrung K. // *Enz. Microb. Technol.* 2010. V. 46. P. 557–561.
52. Barnett M.J., Fisher R.F., Jones T., Komp C., Abola A.P., Barloy-Hubler F., Bowser L., Capela D., Galibert F., Gouzyet J., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. № 17. P. 9883–9888.
53. Ambard-Bretteville F., Small I., Grandjean O., Colas des Francs-Small C. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. V. 311. P. 966–971.
54. Weerasinghe P.A., Weerasekera M.L.M.C., van Holm L.H.J. // *Biologia Plantarum.* 1999. V. 42. P. 541–547.
55. Colic S., Milatovic D., Nikolic D., Zec G. // *Hort. Sci. (Prague).* 2010. V. 37. P. 56–61.
56. Colich S., Milatovich D., Nikolich D., Zec G. // *Bulgarian J. Agricul. Sci.* 2009. V. 15. P. 552–556.
57. Farinelli M.P., Fry D.W., Richardson K.E. // *Plant Physiol.* 1983. V. 73. P. 858–859.
58. Садыхов Э.Г., Серов А.Е., Ясный И.Е., Войнова Н.С., Алексеева А.А., Петров А.С., Тишков В.И. // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия.* 2006. Т. 47. № 1. С. 31–34.
59. Baack R.D., Markwell J., Herman P.L., Osterman J.C. // *J. Plant Physiol.* 2003. V. 160. P. 445–450.
60. Li R., Ziola B., King J. // *J. Plant Physiol.* 2000. V. 157. P. 161–167.
61. Uotila L., Koivusalo M. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1979. V. 196. P. 33–45.
62. Ohyama T., Yamazaki I. // *J. Biochem.* 1975. V. 77. P. 845–852.
63. Peacock D., Boulter D. // *Biochem. J.* 1970. V. 120. P. 763–769.
64. Романова Е.Г., Алексеева А.А., Пометун Е.В., Тишков В.И. // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия.* 2010. Т. 51. № 3. С. 156–159.
65. Slusarczyk H., Felber S., Kula M.R., Pohl M. // *Eur. J. Biochem.* 2000. V. 267. P. 1280–1289.
66. Karaguler N.G., Sessions R.B., Clarke A.R., Holbrook J. // *Biotechnol. Lett.* 2001. V. 23. P. 283–287.
67. Серов А.Е. Взаимосвязь структуры и свойств рекомбинантных формиадегидрогеназ из пекарских дрожжей и метилотрофных бактерий: Дис. ... канд. хим. наук. М.: МГУ им. М.В. Ломоносова, 2002.
68. Serov A.E., Popova A.S., Fedorchuk V.V., Tishkov V.I. // *Biochem. J.* 2002. V. 367. P. 841–847.
69. Seelbach K., Riebel B., Hummel W., Kula M.-R., Tishkov V.I., Egorov A.M., Wandrey C., Kragl U. // *Tetrahedron Lett.* 1996. V. 37. № 9. P. 1377–1380.
70. Rissom S., Schwarz-Linek U., Vogel M., Tishkov V.I., Kragl U. // *Tetrahedron: Assymetry.* 1997. V. 8. № 15. P. 2523–2526.
71. Садыхов Э.Г., Серов А.Е., Войнова Н.С., Угланова С.В., Петров А.С., Алексеева А.А., Клейменов С.Ю., Попов В.О., Тишков В.И. // *Прикл. биохимия и микробиол.* 2006. Т. 42. № 3. С. 269–273.
72. Садыхов Э.Г. Получение, термостабильность и структурные исследования формиадегидрогеназ из различных источников: Дис. ... канд. хим. наук. М.: Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 2007.
73. Resch A., Rosenstein R., Nerz C., Gotz F. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. V. 71. № 5. P. 2663–2676.
74. Савин С.С., Тишков В.И. // *Acta Naturae.* 2010. Т. 2. № 1(4). С. 80–84.
75. Шабалин И.Г., Серов А.Е., Скиргелло О.Е., Тимофеев В.И., Самягина В.Р., Попов В.О., Тишков В.И., Куранова И.П. // *Кристаллография.* 2010. Т. 55. № 5. С. 855–859.
76. Alekseeva A.A., Shabalin I.G., Polyakov K.M., Tishkov V.I. // *J. Biotechnol.* 2010. V. 150. № S1. P. 476.
77. Тишков В.И., Угланова С.В., Федорчук В.В., Савин С.С. // *Acta Naturae.* 2010. Т. 2. № 2(5). С. 86–92.

УДК 578.242.42/.44+578.282;578.11

Скрининг потенциальных ингибиторов/блокаторов репликации ВИЧ-1 с помощью безопасной лентивирусной системы *in vitro*

М. М. Прокофьева^{1*}, П. В. Спирин¹, Д. В. Январев¹, А. В. Иванов¹, М. С. Новиков²,
О. А. Степанов¹, М. Б. Готтих³, С. Н. Кочетков¹, В. Fehse⁴, С. Stocking⁵, В. С. Прасолов^{1*}

¹Учреждение Российской академии наук Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32, Россия

²Волгоградский государственный медицинский университет, 400131, Волгоград, ул. Павших Борцов, 1, Россия

³Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119899, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40, Россия

⁴Research Department Cell and Gene Therapy, Department for Stem Cell Transplantation University Medical Center Hamburg-Eppendorf, D-20246, Hamburg, Martinistr., 52, Germany

⁵Heinrich-Pette-Institute for Experimental Virology and Immunology, D-20251, Hamburg, Martinistr., 52, Germany

*E-mail: m.prokofjeva@gmail.com, prassolov45@mail.ru

Поступила в редакцию 08.07.2011 г.

РЕФЕРАТ Разработка безопасных клеточных систем, позволяющих тестировать соединения, обладающие анти-ВИЧ-активностью, весьма важна для создания новых противовирусных препаратов. Нами детально охарактеризована разработанная ранее на основе лентивирусных векторов система (Prokofjeva et al., *Antiviral Therapy*, в печати) для быстрого и полностью безопасного скрининга потенциальных ингибиторов репликации ВИЧ-1. Система позволяет проводить испытания ингибиторной активности соединений, действие которых направлено как на обратную транскриптазу и интегразу ВИЧ-1 дикого типа, так и на мутантные ферменты, соответствующие лекарственно-устойчивым формам вируса. Получены результаты тестирования ряда известных препаратов, которые хорошо согласуются с опубликованными данными, а также вновь синтезированных соединений. Применение этой системы существенно расширяет возможности доклинических испытаний анти-ВИЧ-препаратов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ВИЧ, лентивирусные векторы, псевдо-ВИЧ-1-частицы, нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы, ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы, ингибиторы интегразы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ВИЧ – вирус иммунодефицита человека; ОТ – обратная транскриптаза; ВВС – вирус везикулярного стоматита; eGFP – усиленный зеленый флуоресцентный белок; АЗТ – 3'-азидо-3'-дезокситимидин; ИД₅₀ – концентрация ингибитора, при которой на 50% снижается уровень заражения.

ВВЕДЕНИЕ

Вирус иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1), относящийся к роду лентивирусов семейства ретровирусов, вызывает одно из широко распространенных и опасных для жизни человека заболеваний – синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД). Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), число ВИЧ-1-инфицированных к концу 2008 г. превысило 33 миллиона человек [1]. В Российской Федерации по официальным данным на 2010 г. количество инфицированных ВИЧ-1 достигло 520000

человек [2]. Следует отметить, что реальное число инфицированных может быть в 2–3 раза больше. Из прогнозов ВОЗ и неправительственных организаций следует, что даже при выполнении всех инициатив по контролю за распространением СПИДа и применению анти-ВИЧ-терапии число ВИЧ-1-инфицированных в ближайшие несколько лет может превысить 48 миллионов.

Несмотря на огромные усилия, до сих пор не создано ни одной действенной профилактической или терапевтической анти-ВИЧ-1-вакцины. Единственным

терапевтическим подходом при ВИЧ-инфекции остается использование низкомолекулярных ингибиторов разных стадий репликативного цикла вируса. К настоящему моменту создано около 30 соединений различной структуры, утвержденных в качестве лекарственных средств. Большинство из них – ингибиторы трех ферментов ВИЧ-1: обратной транскриптазы (ОТ), интегразы и протеазы, а в последние годы добавились и так называемые ингибиторы слияния – блокаторы проникновения вируса в клетку [3]. Одновременное применение нескольких соединений разного типа в рамках высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ) позволяет достигать относительно длительного и заметного снижения титра вируса в крови и, как следствие, существенно продлевать жизнь больного [4, 5]. Тем не менее использование всех этих соединений имеет несколько ограничений. Во-первых, пожизненное носительство вирусной инфекции делает необходимым многолетний прием лекарственных средств, при котором возникают новые мутантные формы вируса, устойчивые к используемым препаратам и способные распространяться в популяции. Это уже привело к тому, что в США и Европе примерно у 10% больных, никогда не принимавших антиретровирусные средства, выявляют формы вируса, невосприимчивые к одному или даже ко всем перечисленным выше классам анти-ВИЧ-1-препаратов [6]. Во-вторых, необходимость длительной терапии часто ставит на первый план возможное побочное действие противовирусных средств [7, 8]. Таким образом, поиск новых соединений, обладающих анти-ВИЧ-1-активностью, представляет крайне важную задачу современной вирусологии и медицинской химии. При этом необходимо создавать новые, относительно безопасные для больного соединения, активные в отношении как вируса дикого типа, так и его лекарственно-устойчивых форм.

Важный этап разработки новых антиретровирусных средств – проверка их эффективности. Большинство лабораторий, занятых поиском новых анти-ВИЧ-соединений, не имеют возможности работать непосредственно с инфекционным репликативно-компетентным вирусом. Такого рода исследования, включающие контакт персонала с природным вирусом, могут проводиться только в сертифицированных лабораториях в условиях, гарантирующих безопасность работы персонала и имеющих разрешение на работу с инфекционными материалами третьего класса опасности. В связи с этим разработка и использование безопасных клеточных систем для тестирования противовирусной активности весьма важны для создания новых лекарственных средств. Особый интерес для быстрого и полностью безопасного скрининга потенциальных ингибиторов

репликации ВИЧ-1 представляют лентивирусные векторы, функциональная эффективность которых проявляется в результате активности всех ферментов ВИЧ-1.

Векторы на основе простых и сложных ретровирусов уже начиная с первой половины 80-х годов прошлого столетия интенсивно использовались как мощные универсальные инструменты, в том числе для создания эффективных систем переноса, экспрессии различных генов и интерферирующих РНК в клетках человека и животных как *in vitro*, так и *in vivo* [9–13].

Лентивирусные векторы использовались в нашей и других лабораториях для создания безопасных систем скрининга ингибиторов репликации ВИЧ-1 дикого типа [14–18]. Такие системы представляют собой рекомбинантный лентивирус, несущий фрагмент генома ВИЧ-1 без областей, кодирующих белки вируса, и содержащий ген репортерного (маркерного) белка (например, зеленого флуоресцентного белка). Кроме того, в состав псевдовирусных частиц входят ферменты репликации ВИЧ-1 (обратная транскриптаза, интегразы и протеазы), что обеспечивает возможность синтеза ДНК-копии такого генома и его встраивание в геном клетки-хозяина по тому же механизму, что и у инфекционного ВИЧ-1. Существенно, что такие псевдо-ВИЧ-1-частицы могут нести, по желанию исследователей, на своей поверхности белки оболочки ВИЧ-1 или других оболочечных вирусов, например G-белок вируса везикулярного стоматита. Это дает возможность использовать определенные линии эукариотических клеток (клетки-мишени) и обеспечивать достаточно высокую эффективность их заражения. Сборка ВИЧ-1-подобных частиц в этой системе происходит согласно модифицированной процедуре, разработанной для конструирования вирусоподобных частиц на основе вируса лейкоза мышей, родственного ВИЧ-1 [19] (рис. 1). Эта процедура заключается во внесении в культивируемые клетки почки эмбриона человека (так называемые упаковывающие клетки) по отдельности плазмид, содержащих а) ген *gag-pol* ВИЧ-1, кодирующий структурные белки для формирования капсида вирусной частицы и ферменты ВИЧ-1; б) ген *env*, кодирующий гликопротеины оболочки ВИЧ-1, или ген белка оболочки иного вируса и в) провирусную ДНК, кодирующую рекомбинантный РНК-геном, в состав которого входит маркерный ген флуоресцентного белка. После внесения всех перечисленных компонентов в упаковывающие клетки в них происходит синтез вирусных белков и рекомбинантной РНК, обеспечивающих формирование ВИЧ-1-подобных частиц, выходящих в культуральную среду. Добавление таких частиц к клеткам-мишеням приводит к тому, что в этих

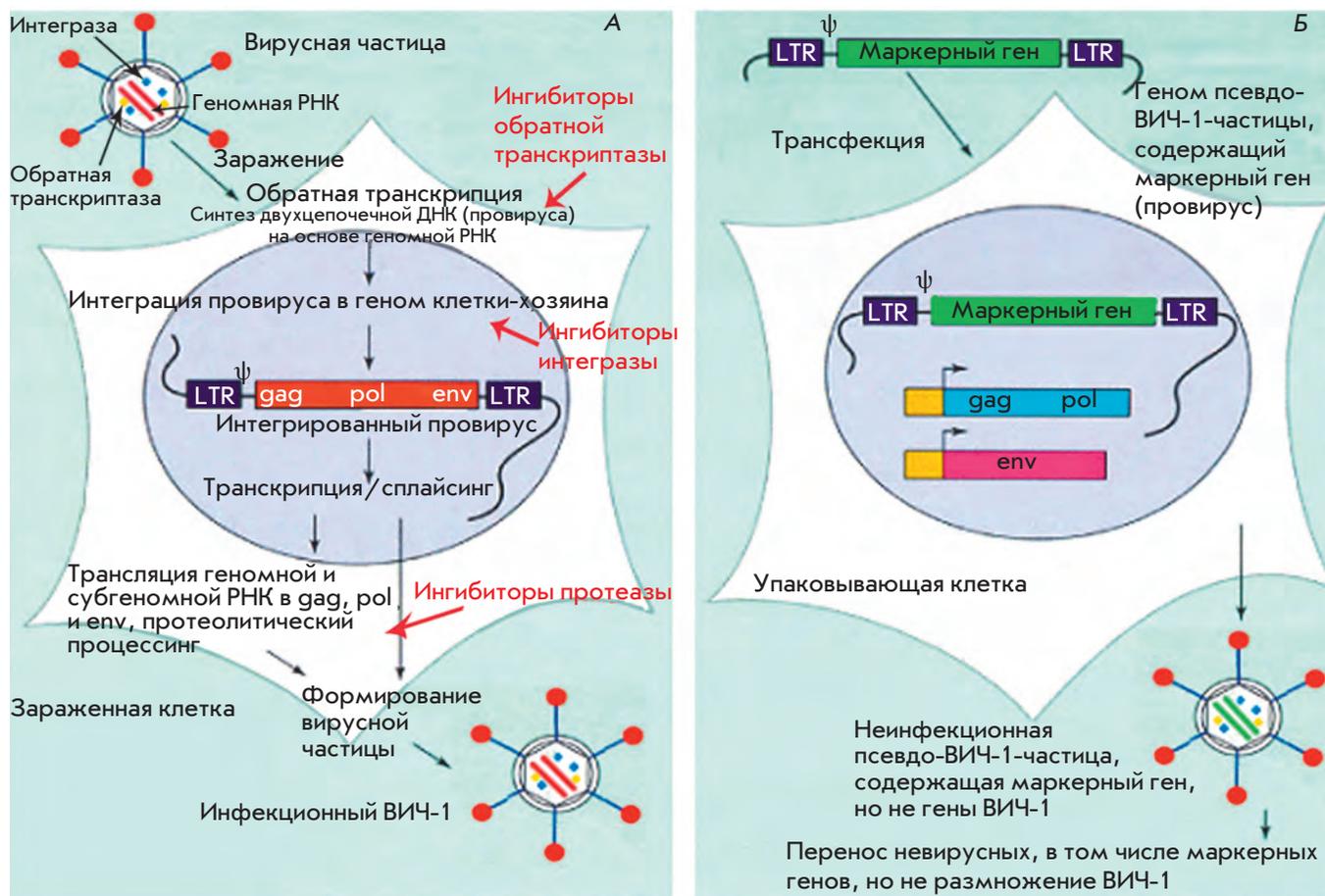


Рис. 1. Жизненный цикл инфекционного ВИЧ-1 (А) и получение рекомбинантных псевдо-ВИЧ-1-частиц в упаковывающих клетках (Б).

клетках на рекомбинантном РНК-геноме синтезируется ДНК провируса, содержащего маркерный ген, встраивание которого в геном клетки-мишени придает ей способность флуоресцировать. Следует особо отметить, что использование плазмидных ДНК, экспрессирующих по отдельности вирус-специфические белки, позволяет конструировать любые варианты псевдо-ВИЧ-1-частиц с одной или несколькими мутациями в любом из ферментов репликации вируса, которые соответствуют лекарственно-устойчивым штаммам ВИЧ-1.

К сожалению, в опубликованных к настоящему времени работах содержится лишь ограниченное число примеров успешного использования подобных систем для изучения антиретровирусной активности веществ различной природы, при этом универсальность описанных систем неочевидна. В связи с этим, основная цель нашей работы состояла в доказательстве адекватности предложенной клеточной системы для скрининга потенциальных анти-ВИЧ-1-препаратов. Мы проверили активность ряда

ингибиторов обратной транскриптазы и интегразы ВИЧ-1 как применяющихся в медицинской практике, так и находящихся на разных стадиях лабораторных исследований.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культивирование клеток

В работе использовали клетки линий HEK293 (клетки эмбриональной почки человека), SC-1 (эмбриональные фибробласты мыши), Jurkat (Т-лимфобластный лейкоз человека), CEM-SS (Т-лимфобластный лейкоз человека) и Kasumi-1 (острый миелоидный лейкоз человека). Клетки линий HEK293 и SC-1 культивировали в среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (Fetal Calf Serum, FCS), 4 мМ L-глутамин, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина. Клетки линий Jurkat, CEM-SS и Kasumi-1 культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 20% FCS, 4 мМ L-глутамин, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл

стрептомицина. Клетки растили при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂.

Получение псевдо-ВИЧ-1-частиц

В качестве упаковывающих клеток, в которых происходит сборка рекомбинантных лентивирусных частиц (псевдо-ВИЧ-1-частицы), использовали клетки НЕК293, которые за 12–14 ч до начала трансфекции высевали на чашки Петри диаметром 100 мм в количестве 3.0–3.5 × 10⁶ клеток на чашку.

ДНК лентивирусного вектора, содержащего маркерный ген зеленого флуоресцентного белка (GFP), вместе с плазмидами, направляющими синтез белков, необходимых для формирования псевдо-ВИЧ-1-частиц, вводили в клетки НЕК293 методом Са-фосфатной трансфекции. Инфекционные псевдо-ВИЧ-1-частицы начинали собирать через 24 ч после трансфекции с интервалом 12 ч [13].

Вирус титровали на клетках НЕК29, высеянных на 24-луночные планшеты за сутки до заражения. Уровень флуоресценции клеток измеряли на проточном цитофлуориметре Epics 4XL Beckman Coulter (США) через 48 ч после заражения. Титр вируса рассчитывали по формуле $T = NP/V$, где N – количество высеянных клеток; P – доля инфицированных клеток в популяции; V – количество добавленного супернатанта, содержащего псевдо-ВИЧ-1-частицы; T – титр вируса. В работе использовали сборы с титрами вируса 5 × 10⁵–5 × 10⁶.

Исследование антивирусной активности соединений

Для оценки анти-ВИЧ-1-активности к клеткам прибавляли раствор анализируемых соединений в воде или диметилсульфоксиде (ДМСО, конечная концентрация в среде не превышала 0.1%), через 2–8 ч (в зависимости от ингибитора) заражали псевдо-ВИЧ-1-частицами. Относительный уровень заражения определяли методом проточной цитофлуориметрии на приборе Epics 4XL Beckman Coulter (США) через 48 ч после заражения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Конструирование псевдо-ВИЧ-1-частиц и инфицирование ими различных линий эукариотических клеток

Важнейшими параметрами лентивирусной системы являются эффективность трансдукции клеток-мишеней псевдо-ВИЧ-1-частицами и, как следствие, уровень флуоресценции полученных трансгенных клеток. Эти параметры зависят от строения псевдовирусных частиц (вида белков оболочки) и линии инфицируемых клеток-мишеней. В качестве клеток-

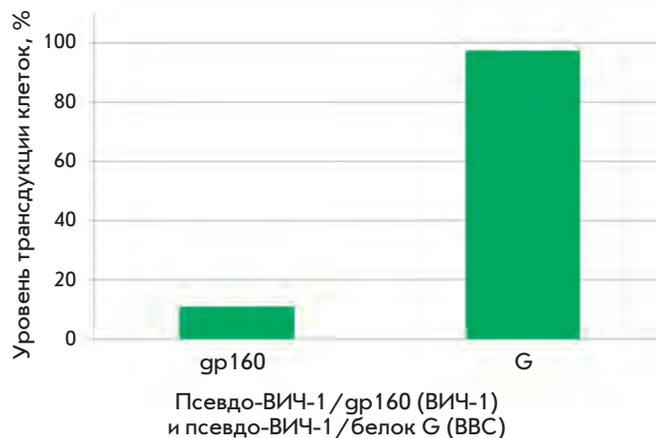


Рис. 2. Уровень трансдукции клеток линии Jurkat псевдо-ВИЧ-1-частицами, содержащими в качестве белка оболочки белок gp160 ВИЧ-1 или белок G вируса везикулярного стоматита (ВВС).

мишеней мы использовали перевиваемые лимфобластные клетки крови человека Jurkat и СЕМ-SS (Т-лимфобластный лейкоз, содержат специфические рецепторы ВИЧ-1), Kasumi-1 (острый миелоидный лейкоз), а также фибробласты эмбриона мыши SC-1.

Нами получены и изучены два типа псевдо-ВИЧ-1-частиц, отличающихся друг от друга белками оболочки. Частицы первого типа содержат белок оболочки gp160 (SUgp120 + TMgp41) ВИЧ-1; второго – белок оболочки G вируса везикулярного стоматита (ВВС). Использование частиц первого типа приводило к сравнительно невысокой эффективности трансдукции и более слабому сигналу флуоресценции (данные не приведены) от инфицированных клеток (рис. 2). В случае псевдо-ВИЧ-1-частиц, несущих белок G ВВС, доля инфицированных клеток и уровень экспрессии маркерного зеленого флуоресцентного белка (eGFP) были существенно выше (рис. 2). Кроме того, с помощью частиц, псевдотипированных белком G ВВС, при необходимости можно переносить маркерные гены в клетки широкой видовой и тканевой специфичности. Такой прием может позволить проводить поиск ингибиторов ретровирусов, поражающих и иные, чем кровь, ткани. Поэтому в большинстве опытов по изучению свойств ингибиторов обратной транскриптазы и интегразы ВИЧ-1 использовали именно псевдо-ВИЧ-1-частицы с белком G ВВС.

Нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы ВИЧ-1

Модифицированные нуклеозиды и нуклеотиды широко используются в терапии различных вирусных заболеваний, в том числе ВИЧ-1-инфекции [3]. Механизм их действия включает превращение этих

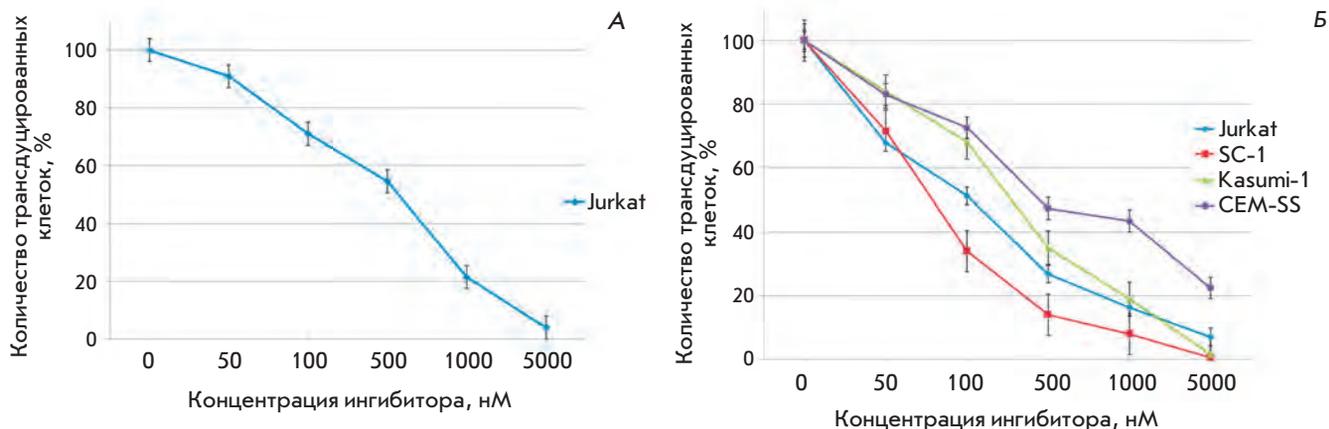


Рис. 3. Действие АЗТ на эффективность трансдукции клеток разных линий псевдо-ВИЧ-1-частицами, содержащими белок оболочки gp160 (А) или белок оболочки G ВВС (Б). Показан уровень трансдукции относительно положительного контроля.

соединений в клетке в соответствующие нуклеозидтрифосфаты, которые служат терминирующими субстратами для вирусных ДНК- и РНК-полимераз. Встраивание нуклеотидов в растущую цепь вирусной ДНК/РНК блокирует репликацию вируса и обеспечивает подавление развития инфекции. Первое и наиболее известное анти-ВИЧ-1-средство данного класса – 3'-азидо-3'-дезокситимидин (АЗТ), в наномолярных концентрациях способный ингибировать репликацию вируса. Мы изучили противовирусную активность АЗТ в отношении псевдо-ВИЧ-1-частиц, несущих белок оболочки gp160 ВИЧ-1 или G ВВС, на своей поверхности. На рис. 3 показано, как АЗТ влияет на эффективность трансдукции клеток ВИЧ-1-подобными частицами, содержащими обратную транскриптазу, интегразу дикого типа и белок оболочки gp160 ВИЧ-1 (А) или белок G вируса везикулярного стоматита (Б). Видно, что АЗТ подавляет инфицирование эукариотических клеток псевдовидными частицами обоих типов, хотя и в более высоких концентрациях, чем инфекционным ВИЧ-1 (таблица) [20–22]. В культуре клеток Jurkat активность препарата была выше в отношении частиц, псевдотипированных белком G ВВС. Противовирусная активность нуклеозида зависела не только от типа частиц, но и от линии клеток-мишеней. Так, максимальный эффект отмечен на фибробластах мыши SC-1, а минимальный – при использовании клеток CEM-SS. Причинами подобных различий могут быть разное внутриклеточное содержание нуклеозид- и нуклеотидкиназ [30] – ферментов, необходимых для превращения нуклеозида в соответствующий трифосфат, а также от различий в уровнях экспрессии специфических транспортеров, отвечающих за транспорт препарата в клетку или его выведение [31].

Другие известные и широко распространенные антиретровирусные средства – 2',3'-дидезокси-3'-тиоцитидин (ЗТС) и 2',3'-дидезокси-2',3'-дидегидротимидин (d4Т), которые, как и АЗТ, представляют собой нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы ВИЧ-1 [3]. ЗТС был синтезирован в 1989 г. и одобрен для клинического применения в 1995. В настоящее время он применяется в комбинации с другими препаратами. Показана эффективность совместного применения ЗТС и АЗТ. Мы оценили противовирусную активность ЗТС на клетках линий Jurkat и CEM-SS (рис. 4). Активность препарата в нашей системе была несколько ниже, чем из-

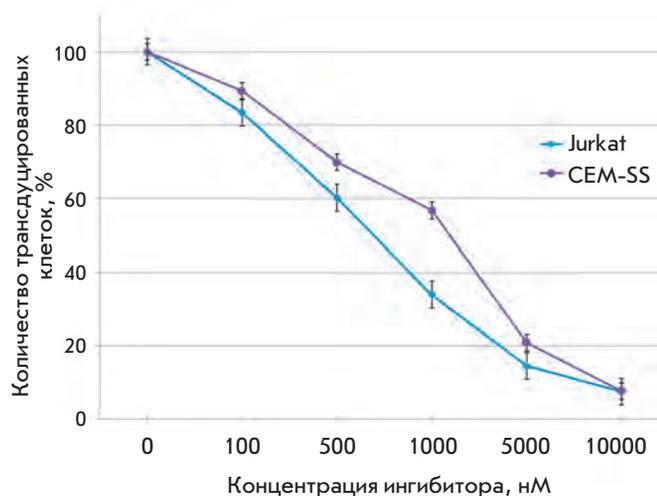


Рис. 4. Действие ЗТС на эффективность трансдукции клеток линий Jurkat и CEM-SS псевдо-ВИЧ-1-частицами, содержащими белок оболочки G ВВС. Показан уровень трансдукции относительно положительного контроля.

Противовирусная активность исследованных соединений в отношении псевдо-ВИЧ-1-частиц, псевдотипированных белком G вируса везикулярного стоматита

Соединение	Клеточная линия	ИД ₅₀ , мкМ	
		Эксперимент	Лит. данные [20–29]
АЗТ	Jurkat	0.1 ± 0.01	0.004–0.1
	SC-1	0.08 ± 0.005	
	Kasumi-1	0.3 ± 0.02	
	CEM-SS	0.46 ± 0.05	
ЗТС	Jurkat	0.7 ± 0.05	0.02–0.35
	CEM-SS	0.85 ± 0.05	
d4T	Jurkat	7 ± 0.5	0.43–1.67
	SC-1	10 ± 0.5	
ddC	Jurkat	7 ± 0.5	0.067–0.316
	SC-1	5 ± 0.5	
ddI	Jurkat	>20	1.79–12
	SC-1	>20	
Невирапин	Jurkat	0.1 ± 0.005	0.0072–0.22
	SC-1	0.15 ± 0.005	
	Kasumi-1	0.08 ± 0.005	
	CEM-SS	0.2 ± 0.01	
Ненуклеозидный ингибитор ОТ 1	Jurkat	0.95 ± 0.05	0.13
Ненуклеозидный ингибитор ОТ 2	Jurkat	0.08 ± 0.001	0.016
Ненуклеозидный ингибитор ОТ 3	Jurkat	0.085 ± 0.001	0.018
Ралтегравир	Jurkat	0.009 ± 0.0005	0.0022–0.0037
	SC-1	0.006 ± 0.0005	
	CEM-SS	0.009 ± 0.0005	
L-731,988	Jurkat	12 ± 0.1	1
	SC-1	8 ± 0.1	

вестно из опубликованных данных (таблица) [20, 24]. Активность других аналогов нуклеозидов, включая d4T, в нашей системе также была ниже, чем показанная на инфекционном ВИЧ-1 (таблица) [20, 21, 24].

Ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы ВИЧ-1

Наиболее широко используемым ненуклеозидным блокатором репликации ВИЧ-1 – ингибитором обратной транскриптазы, является невирапин [3]. Утвержденное в качестве лекарственного средства в 1996 г., в концентрации 10^{-8} – 10^{-7} М это соединение способно подавлять развитие ВИЧ-1-инфекции в клетках, зараженных природным вирусом. Мы исследовали способность невирапина предотвращать трансдукцию клеток-мишеней описанными выше псевдо-ВИЧ-1-частицами. Как и АЗТ, невирапин проявлял более высокую антивирусную активность в отношении псевдовирусных частиц, несущих на своей поверхности белок G ВВС (рис. 5). Так же как и АЗТ, невирапин был наиболее эффективен в культуре фибробластов SC-1, а наименее – на линии CEM-SS. Особо

следует подчеркнуть, что активность невирапина в нашей системе была сопоставима с его активностью в отношении инфекционного ВИЧ-1 [21, 25].

Кроме коммерческого препарата невирапина, мы протестировали три новых ненуклеозидных ингибитора, обозначенных номерами 1, 2 и 3, синтезированных как описано в работе [27]. Эти соединения представляют собой N¹-замещенные урацилы, несущие бензофеноноксиэтильный (2 и 3) или бензилфеноноксиэтильный фрагменты (1). Ранее мы показали, что эти соединения обладают высокой анти-ВИЧ-1-активностью в культуре клеток, инфицированных вирусом дикого типа [27]. Было продемонстрировано, что все три соединения способны предотвращать трансдукцию клеток SC-1 псевдо-ВИЧ-1-частицами с белком G ВВС, причем активность бензофенонсодержащих соединений (2 и 3) существенно превышала активность бензилфеноноксиэтилурацильного производного урацила (1) (рис. 6) и была сравнима с активностью невирапина. Полученные данные хорошо коррелируют с результатами изучения этих веществ в инфекционной клеточной системе (таблица).

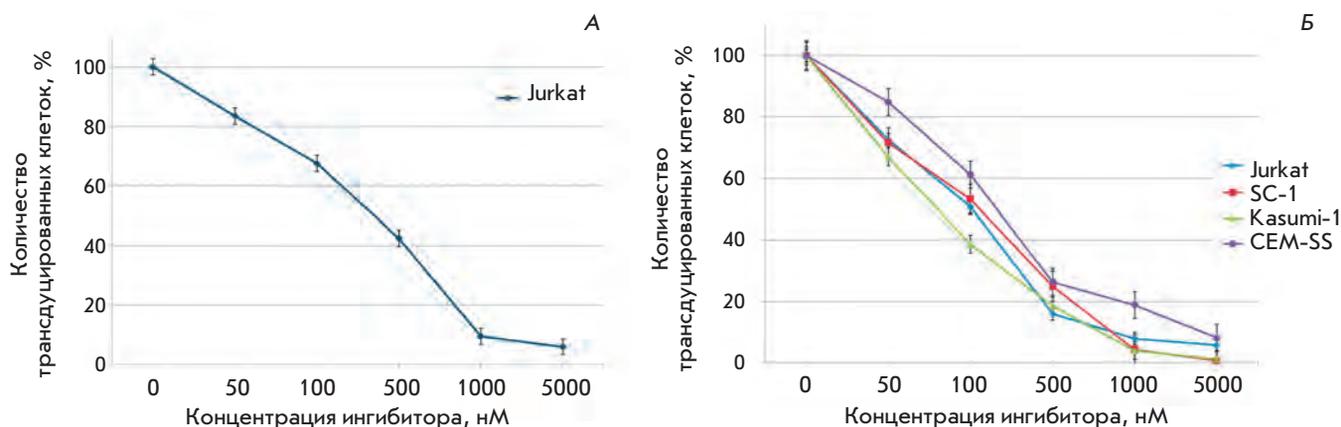


Рис. 5. Действие невриапина на эффективность трансдукции клеток разных линий псевдо-ВИЧ-1-частицами, содержащими белок оболочки gp160 (А) или белок оболочки G BVC (Б). Показан уровень трансдукции относительно положительного контроля.

Ингибиторы интегразы ВИЧ-1

С целью оценки возможностей разработанной системы для скрининга ингибиторов интегразы использовали коммерческий препарат ралтегравир, разрешенный к применению в клинической практике с октября 2007 г., и известный ингибитор фермента L-731,988 [28]. Ралтегравир и L-731,988 блокируют вторую стадию интеграции – перенос цепи, препятствуя связыванию интегразы с клеточной ДНК. На рис. 7 приведена зависимость эффективности трансдукции клеток псевдо-ВИЧ-1-частицами с интегразой дикого типа от концентрации ингибиторов. Видно, что активность ралтегравира примерно на три порядка выше, чем у L-731,988, что согласуется с данными, полученными в инфекционной системе [28, 32]. Снижение числа флуоресцирующих клеток в присутствии ингибиторов интегразы свидетельствует о том, что в предложенной нами псевдовиральной системе происходит полноценная интеграция синтезированной ДНК в геном клетки-мишени, а псевдо-ВИЧ-1-частицы действительно могут служить удобным инструментом для изучения противовирусной активности ингибиторов интегразы вируса.

Псевдо-ВИЧ-1-частицы, устойчивые к действию АЗТ

Поиск потенциальных ингибиторов репликации лекарственно-устойчивых штаммов ВИЧ-1 представляет собой важнейшую задачу. Однако такие работы часто ограничены не только необходимостью использования инфекционного вируса, опасного для персонала лаборатории, но и сложностью получения штаммов, нечувствительных к препаратам заданной группы. Предложенная нами система позволяет легко конструировать варианты псевдо-ВИЧ-1-частиц, несущих ферменты репликации с мутациями, определяющими устойчивость к лекарственным средствам.

Это подтверждено получением трех типов псевдо-ВИЧ-1-частиц с точечными заменами D67N, K70R, T215F и K219Q в обратной транскриптазе, наиболее характерными для штаммов ВИЧ-1, резистентных к АЗТ [33, 34]. Сравнение противовирусной активности АЗТ в отношении этих вариантов псевдовиральных частиц показало, что препарат гораздо слабее влиял на эффективность трансдукции мутантными частицами (рис. 8), причем падение ингибирующего эффекта коррелировало с увеличением числа мутаций (этот эффект наиболее ярко выражен в клетках SC-1). В то же время невриапин, ненуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы ВИЧ-1, сохранял свою активность в отношении всех АЗТ-устойчивых типов

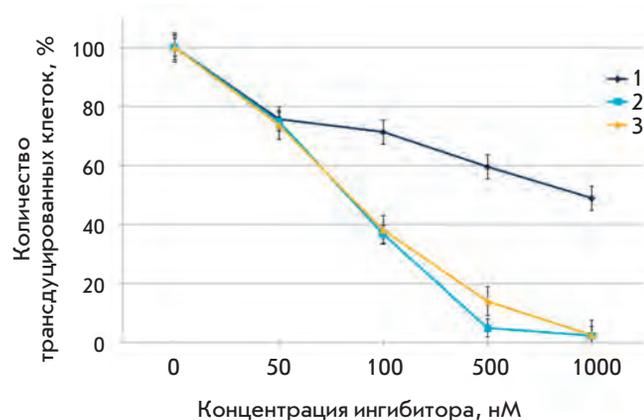


Рис. 6. Действие ненуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы ВИЧ-1 1, 2 и 3 на эффективность трансдукции клеток линии Jurkat псевдо-ВИЧ-1-частицами, содержащими белок оболочки G BVC. Показан уровень трансдукции относительно положительного контроля.

Рис. 7. Действие ингибиторов интегразы ВИЧ-1 ралтегравира (основной рисунок) и L-731,988 (вставка) на эффективность трансдукции клеток разных линий псевдо-ВИЧ-1-частицами, содержащими белок оболочки G VBC. Показан уровень трансдукции относительно положительного контроля.

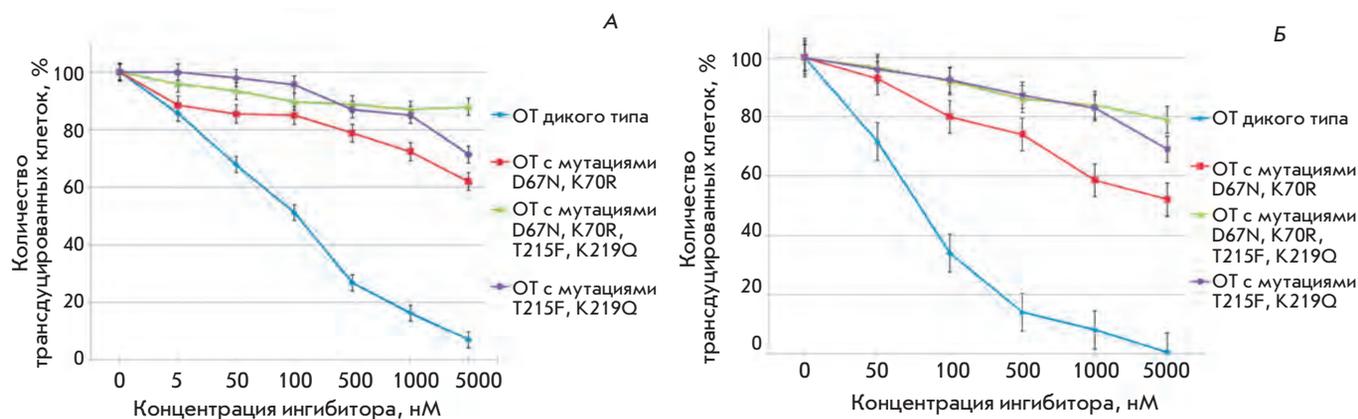
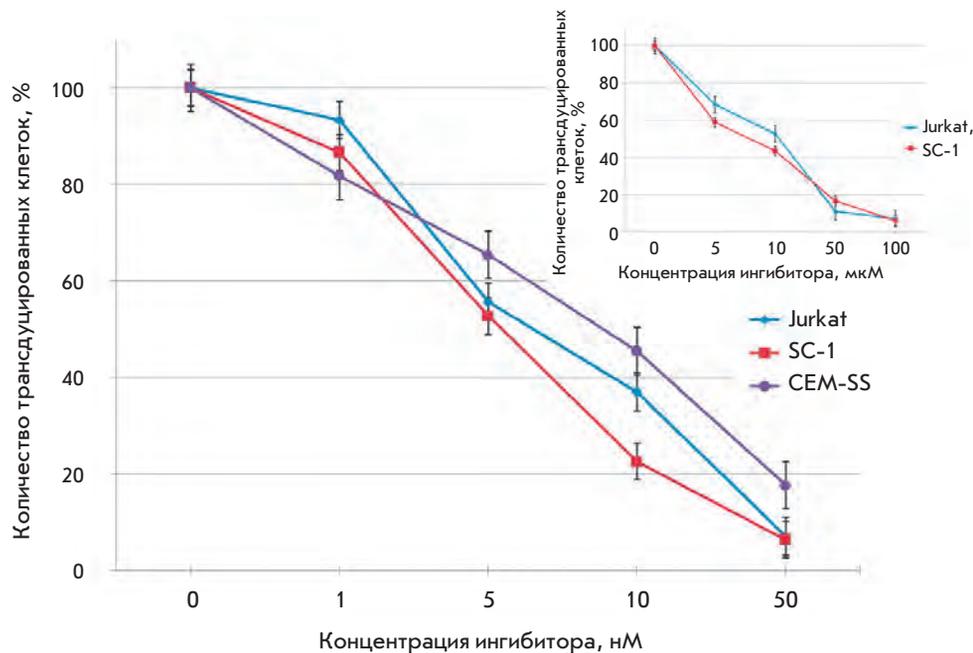


Рис. 8. Действие АЗТ на эффективность трансдукции клеток псевдо-ВИЧ-1-частицами, содержащими белок оболочки G VBC и обратную транскриптазу дикого типа или ее мутантные формы, на клетках линий Jurkat (А) и SC-1 (Б). Показан уровень трансдукции относительно положительного контроля.

псевдовирусных частиц (рис. 9). Это объясняется тем, что сайт связывания АЗТ удален от активного центра фермента, с которым взаимодействует трифосфат АЗТ и в котором находятся все означенные мутации. Таким образом, псевдо-ВИЧ-1-частицы действительно позволяют изучать способность веществ ингибировать лекарственно-устойчивые формы вируса.

Аналоги неорганического пирофосфата

Отдельное направление подходов к терапии лекарственно-устойчивых форм ВИЧ-1 представляет поиск соединений, совместное использование которых с уже применяемыми антиретровирусными средствами приводит к восстановлению чувстви-

тельности вируса к антиретровирусным средствам. Согласно современным представлениям, устойчивость ВИЧ-1 к нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы может формироваться с использованием двух альтернативных механизмов, включающих возникновение в обратной транскриптазе мутаций:

- а) препятствующих взаимодействию фермента с соответствующими нуклеозидтрифосфатами (описано для ЗТС) или
- б) способствующих выщеплению уже включенного терминирующего нуклеотида из ДНК в процессе реакции пирофосфоролиза, после которой синтез растущей цепи ДНК может быть продолжен (этот механизм считается основным для АЗТ) (рис. 10).

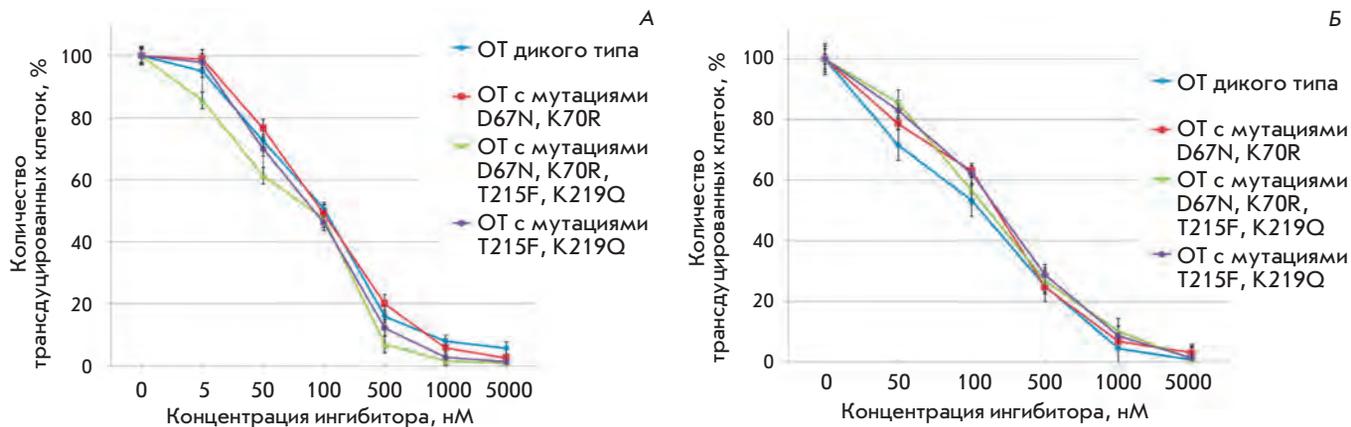
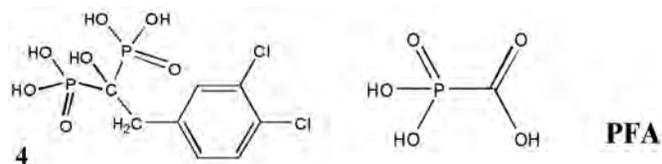


Рис. 9. Действие невриапина на эффективность трансдукции клеток псевдо-ВИЧ-1-частицами, содержащими белок оболочки G BSC и обратную транскриптазу дикого типа или мутантные формы, на клетках линий Jurkat (А) и SC-1 (Б). Показан уровень трансдукции относительно положительного контроля.

В настоящее время описан ряд соединений-миметиков неорганического пирофосфата, способных подавлять выщепление нуклеотидов при пирофосфоролизе [35, 36]. Один из них, фоскарнет (PFA), успешно применяется в комбинации с АЗТ [37], что подтверждает перспективность использования негидролизующихся аналогов неорганического пирофосфата в сочетании с нуклеозидными ингибиторами при терапии СПИДа [37].



Наиболее перспективным типом аналогов неорганического пирофосфата считаются производные гидроксиметилдифосфоновой кислоты, которые применяются в терапии костных патологий. В отличие от фоскарнета, соединения этого ряда не являются субстратами в реакции пирофосфоролиза. Тем не менее они эффективно ингибируют пирофосфоролитическое выщепление АЗТ из ДНК, катализируемое обратной транскриптазой ВИЧ-1 [36]. При этом следует отметить отсутствие публикаций об их активности в клеточных системах. В представленной работе для оценки адекватности предлагаемой клеточной системы и изучения веществ данного типа были испытаны фоскарнет (PFA) и аналог неорганического пирофосфата – бисфосфонат 4. Дихлорбензильное производное метилдифосфоновой кислоты 4 является наиболее активным из подобных соединений, оно способно подавлять выщепление монофосфата АЗТ, катализируемое обратной транскриптазой, в субмикромольном диапазоне концентраций [35]. Данные

о совместном действии азидотимидина и указанных ингибиторов пирофосфоролиза приведены на рис. 11. В этом опыте определена степень ингибирования трансдукции клеток АЗТ-устойчивыми псевдо-ВИЧ-1-частицами (несущими точечные замены D67N, K70R, T215F и K219Q в обратной транскриптазе) при добавлении АЗТ в комбинации с выбранным ингибитором пирофосфоролиза. В контрольном эксперименте определяли количество флуоресцирующих клеток в присутствии каждого из этих веществ по отдельности.

Вывод об аддитивности действия АЗТ и аналогов пирофосфата делали, сравнивая степень ингибирования в присутствии двух веществ и произведение степеней ингибирования каждым из соединений (что отражает независимость их действия). Из рис. 11 видно, что фоскарнет и бисфосфонат 4 подавляли инфицирование клеток псевдовиральными частицами, а также заметно и статистически значимо усиливали действие АЗТ. Таким образом, полученные данные впервые показывают возможность восстановления чувствительности резистентных форм ВИЧ-1 к нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы в культуре клеток и свидетельствуют о перспективности аналогов неорганического пирофосфата в качестве потенциальных компонентов антиретровирусной терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С использованием ряда линий клеток человека и мыши показано, что описанная нами система безопасного скрининга потенциальных ингибиторов репликации ВИЧ-1 позволяет проводить испытания ингибиторной активности соединений, действие которых направлено как на обратную транскриптазу и ин-

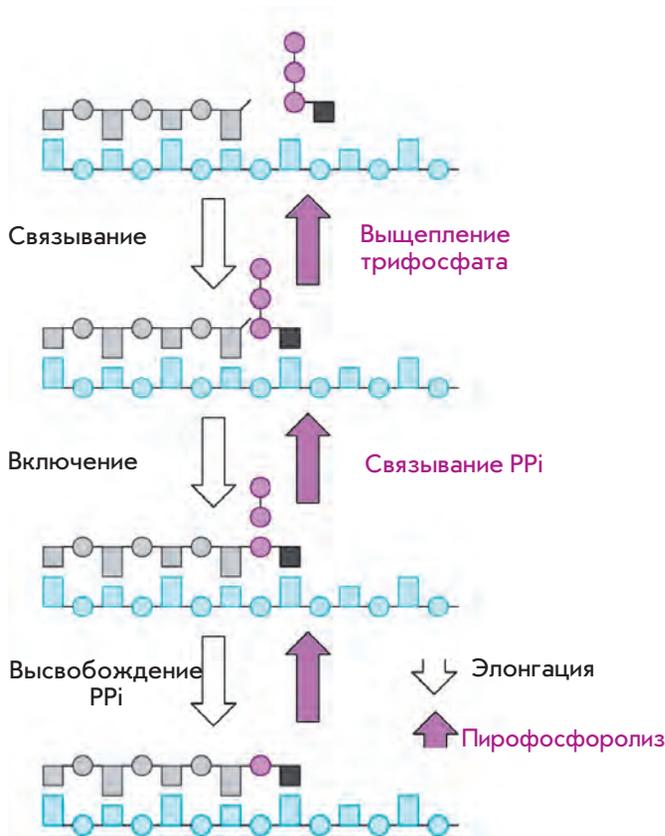


Рис. 10. Механизм реакции пирофосфоролиза, катализируемой обратной транскриптазой.

тегразу ВИЧ-1 дикого типа, так и на их мутантные формы, соответствующие лекарственно-устойчивым формам вируса. Важно, что используемые в этой системе псевдо-ВИЧ-1-частицы неинфекционны и по сути представляют собой вирусы однократного действия (рекомбинантные лентивирусные векторы), содержащие полный набор вирусных ферментов, обеспечивающих синтез рекомбинантного двухцепочечного ДНК-провируса и его интеграцию в геном клеток-мишеней. После этого клеточными системами осуществляется экспрессия маркерных генов, внесенных в геном клетки, в составе рекомбинантного генома псевдо-ВИЧ-1-частиц.

Отсутствие в таком рекомбинантном геноме полного набора ВИЧ-1 гарантирует безопасность испытаний эффективности новых анти-ВИЧ-1-соединений, с одной стороны, и возможность адекватной оценки действия этих соединений на обратную транскриптазу и интегразу ВИЧ-1 в клетках, «зараженных» (трансдуцированными) псевдо-ВИЧ-1-частицами.

Возможность формирования псевдо-ВИЧ-1-частиц, содержащих мутантную «лекарственно-устойчивую» обратную транскриптазу и/или интегразу, позволяет

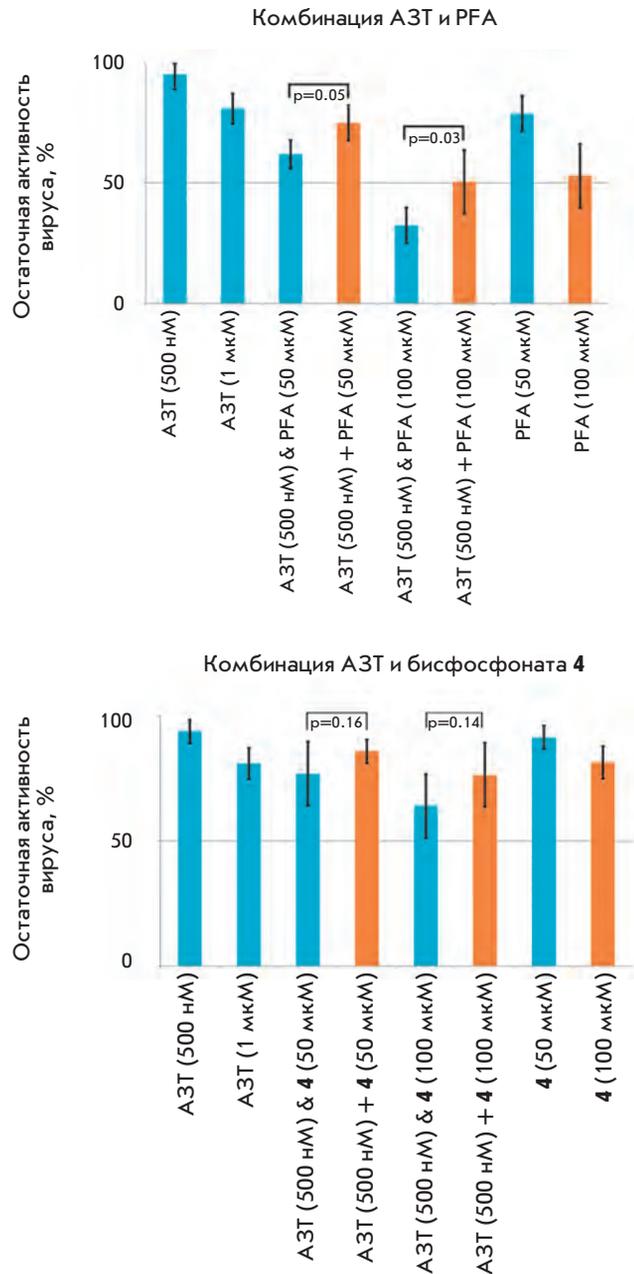


Рис. 11. Подавление вирусной трансдукции комбинацией АЗТ и ингибиторов пирофосфоролиза. Данные представлены как среднее значение серии из пяти экспериментов ± доверительный интервал ($P \leq 0.1$). Значения серий «АЗТ&» получены при одновременном внесении ингибиторов в указанных в скобках концентрациях. Значения серий «АЗТ+» являются расчетной величиной, полученной произведением остаточных активностей индивидуальных ингибиторов в указанных в скобках концентрациях. p – Значение парного двухвыборочного t -теста Стьюдента для указанных значений.

также проводить скрининг потенциальных ингибиторов лекарственно-устойчивых форм ВИЧ-1.

Псевдотипирование псевдо-ВИЧ-1-частицы белками оболочки ретровирусов различной природы, в том числе и белком оболочки gp160 ВИЧ-1, а также других оболочечных вирусов, существенно расширяет возможности системы скрининга, позволяя заражать клетки различных типов, и делает возможным тестирование ингибиторов проникновения вирусов в клетку. Наконец, хотя это и не рассмотрено в настоящей работе, представленная система позволяет исследовать и ингибиторы протеазы ВИЧ-1. ●

Работа поддержана Программами фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и «Основы фундаментальных исследований нанотехнологий и наноматериалов», госконтрактами с Минобрнауки РФ № 16.512.11.2192, 16.512.11.2193, 16.512.12.2006 и 02.740.11.0706 и грантами Российского фонда фундаментальных исследований № 09-04-01221-а, 11-04-12035-офи-м и 11-04-01365-а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 2008 Report on the global AIDS epidemic, World Health Organization.
- <http://www.hivruussia.org/stat/2009/10.shtml>
- De Clercq E. // *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2009. V. 33. № 4. P. 307–320.
- Kuritzkes D.R., Walker B.D. // *Fields Virology* / Eds Knipe D.M., Howley P.M. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2007.
- Hengge U.R., Ruzicka T., Tyring S.K., Stuschke M., Roggen-dorf M., Schwartz R.A., Seeber S. // *Lancet Infect. Dis*. 2002. V. 2. № 5. P. 281–292.
- Wittkop L., Günthard H.F., de Wolf F., Dunn D., Cozzi-Lepri A., de Luca A., Kücherer C., Obel N., von Wyl V., Masquelier B., et al. // *Lancet Infect. Dis*. 2011. V. 11. № 5. P. 363–371.
- Núñez M. // *Hepatology*. 2010. V. 52. № 3. P. 1143–1155.
- Izzedine H., Harris M., Perazella M.A. // *Nat. Rev. Nephrol*. 2009. V. 5. № 10. P. 563–573.
- Panyutich A.V., Prassolov V.S., Shydlovskaya E.A., Reznikov M.V., Chumakov P.M., Voitenuk N.N. // *Hybridoma*. 1990. V. 9. № 4. P. 401–406.
- Prassolov V.S., Meyer J., Brandenburg G., Hannemann J., Bergemann J., Ostertag W., Stocking C. // *Exp. Hematol*. 2001. V. 29. № 6. P. 756–765.
- Спирин П.В., Вильгельм А.Э., Прасолов В.С. // *Молекуляр. биология*. 2008. Т. 42. № 5. С. 913–926.
- Спирин П.В., Баскаран Д., Рубцов П.М., Зенкова М.А., Власов В.В., Черноловская Е.Л., Прасолов В.С. // *Acta Naturae*. 2009. Т. 1. № 2(2). P. 98–103.
- Спирин П.В., Баскаран Д., Орлова Н.Н., Рулина А.В., Никитенко Н.А., Черноловская Е.Л., Зенкова М.А., Власов В.В., Рубцов П.М., Чумаков П.М., и др // *Молекуляр. биология*. 2010. Т. 44. № 5. С. 876–888.
- Kellam P., Larder B. // *Antimicrob. Agents Chemother*. 1994. V. 38. № 1. P. 23–30.
- Walter H., Schmidt B., Korn K., Vandamme A.M., Harrer T., Uberla K. // *J. Clin. Virol*. 1999. V. 13. № 1–2. P. 71–80.
- Jármy G., Heinkelein M., Weissbrich B., Jassoy C., Rethwilm A. // *J. Med. Virol*. 2001. V. 64. № 3. P. 223–231.
- Garcia-Perez J., Sanchez-Palomino S., Perez-Olmeda M., Fernandez B., Alcamí J. // *J. Med. Virol*. 2007. V. 79. № 2. P. 127–137.
- Чересиз С.В., Григорьев И.В., Семенова Е.А., Пустыльняк В.О., Власов В.В., Покровский А.Г. // *ДАН*. 2010. Т. 435. № 1. С. 126–130.
- Прасолов В.С., Чумаков П.М. Вектор pPS-1-нео для введения и экспрессии генов в культивируемых соматических клетках млекопитающих. Авт. свид. 1440036 от 26.06.1987 г. Заявка 4268094.
- Rosenblum L.L., Patton G., Grigg A.R., Frater A.J., Cain D., Erlwein O., Hill C.L., Clarke J.R., McClure M.O. // *Antivir. Chem. Chemother*. 2001. V. 12. № 2. P. 91–97.
- Smith R.A., Gottlieb G.S., Miller A.D. // *Retrovirology*. 2010. V. 7. P. 70–81.
- Bjerke M., Franco M., Johansson M., Balzarini J., Karlsson A. // *Biochem. Pharmacol*. 2008. V. 75. № 6. P. 1313–1321.
- Perez-Bercoff D., Wurtzer S., Compain S., Benech H., Clavel F. // *J. Virol*. 2007. V. 81. № 9. P. 4540–4550.
- Patick A.K., Boritzki T.J., Bloom L.A. // *Antimicrob. Agents Chemother*. 1997. V. 41. № 10. P. 2159–2164.
- Grob P.M., Wu J.C., Cohen K.A., Ingraham R.H., Shih C.K., Hargrave K.D., McTague T.L., Merluzzi V.J. // *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 1992. V. 8. № 2. P. 145–152.
- Witvrouw M., Arranz M.E., Pannecouque C., Declercq R., Jonckheere H., Schmit J.C., Vandamme A.M., Diaz J.A., Ingate S.T., Desmyter J., et al. // *Antimicrob. Agents Chemother*. 1998. V. 42. № 3. P. 618–623.
- Novikov M.S., Ivanova O.N., Ivanov A.V., Ozerov A.A., Valuev-Elliston V.T., Gurskaya G.V., Kochetkov S.N., Pannecouque C., Balzarini J., Seley-Radtke K.L. // *Bioorg. Med. Chem*. 2011. V. 19. № 19. P. 5794–5802.
- Hazuda D.J., Felock P., Witmer M., Wolfe A., Stillmock K., Grobler J.A., Espeseth A., Gabryelski L., Schleif W., Blau C., et al. // *Science*. 2000. V. 287. № 5453. P. 646–650.
- Paprotka T., Venkatachari N.J., Chaipan C., Burdick R., Delviks-Frankenberry K.A., Hu W.S., Pathak V.K. // *J. Virol*. 2010. V. 84. № 11. P. 5719–5729.
- Gröschel B., Höver G., Doerr H.W., Cinatl J., Jr. // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2001. V. 20. № 4–7. P. 487–492.
- Paintsil E., Dutschman G.E., Hu R., Grill S.P., Wang C.J., Lam W., Li F.Y., Ghebremichael M., Northrup V., Cheng Y.C. // *Antimicrob. Agents Chemother*. 2011. V. 55. № 2. P. 895–903.
- Summa V., Petrocchi A., Bonelli F., Crescenzi B., Donghi M., Ferrara M., Fiore F., Gardelli C., Gonzalez Paz O., Hazuda D.J., et al. // *J. Med. Chem*. 2008. V. 51. № 18. P. 5843–5855.
- Arion D., Parniak M.A. // *Drug Resist. Updat*. 1999. V. 2. № 2. P. 91–95.
- Isagulians M.G., Belikov S.V., Starodubova E.S., Gizatullin R.Z., Rollman E., Zuber B., Zuber A.K., Grishchenko O.I., Rytting A.S., Källander C.F., et al. // *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2004. V. 20. № 2. P. 191–201.
- Cruchaga C., Ansó E., Rouzaut A., Martínez-Irujo J.J. // *J. Biol. Chem*. 2006. V. 281. № 38. P. 27744–27752.
- Song Y., Chan J.M.W., Tovian Z., Secrest A., Nagy E., Krysiak K., Bergan K., Parniak M.A., Oldfield E. // *Bioorg. Med. Chem*. 2008. V. 16. P. 8959–8967.
- Jacobson M.A., van der Horst C., Causey D.M., Dehlinger M., Hafner R., Mills J. // *J. Infect Dis*. 1991. V. 163. № 6. P. 1219–1222.

УДК 576.53

Поведение мультипотентных клеток, трансплантированных *in vitro* в поврежденную сетчатку глаза

С. А. Сергеев^{1*}, Ю. В. Храмова¹, М. Л. Семенова¹, И. Н. Сабурин², Н. В. Кошелева^{1,2}¹Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12²Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии РАМН, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

*E-mail: embryossa@gmail.com

Поступила в редакцию 05.08.2011 г.

РЕФЕРАТ Применение клеточных технологий позволило добиться существенного прогресса в лечении дефектов сетчатой оболочки глаза. Уже разработаны протоколы, позволяющие обеспечить нейрональную дифференцировку клеток, трансплантированных в сетчатку. Однако вопросы функционального замещения утраченных нейронов сетчатки трансплантированными клетками остаются открытыми. Для доказательства возможности трансдифференцировки трансплантированных EGFP⁺-клеток стромы костного мозга (ММСК) и нейрональных стволовых/прогениторных клеток (НСПК) мышей с последующей их функциональной интеграцией применен метод органотипического культивирования, позволяющий детально охарактеризовать поведение клеток после трансплантации. Методами атомно-силовой микроскопии показано достоверное отличие ($p < 0.01$) в толщине отростков, формируемых глиальными и эндотелиальными компонентами сетчатки, и отростков нейронов и трансплантированных ММСК, а также формирование синаптических расширений диаметром до 2.5 ± 0.06 мкм введенными ММСК на 4-е сутки после трансплантации.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА стволовые клетки, трансплантация *in vitro*, органотипические культуры сетчатки, пластичность стволовых клеток, репарация сетчатки.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ММСК – клетки стромы костного мозга; НСПК – нейрональные стволовые/прогениторные клетки; EGFP – улучшенный зеленый флуоресцентный белок.

ВВЕДЕНИЕ

Изменения в сетчатой оболочке глаза, вызванные разнообразными внешними повреждающими факторами, часто ведут к частичной или полной потере зрения. Для эффективного лечения при патологических состояниях сетчатки необходимо понимать процессы, вовлеченные в их возникновение и развитие, а также процессы, приводящие к репарации таких состояний. В настоящее время с целью предотвращения развития необратимых нейродегенеративных процессов в сетчатке глаза разрабатываются методы трансплантации клеток с широким дифференцировочным потенциалом – стволовых/прогениторных элементов нервной ткани (НСПК) или клеток стромы костного мозга (ММСК). Считается, что после введения в организм реципиента эти клетки не только активно мигрируют к месту повреждения и замещают своими дифференцированными потомками утраченные элементы ткани, но и секретируют целый спектр трофических и регуляторных факторов, поддерживающих функциональность поврежденной

ткани и активирующих ее собственные системы репарации [1].

К сожалению, накопленный к настоящему времени теоретический и практический материал в области биологии стволовых клеток не позволяет достоверно прогнозировать эффективность терапии при помощи клеточной трансплантации. Мы все еще далеки от полного понимания тех механизмов, которые запускают восстановление ткани реципиента при введении клеток, и в настоящее время не представляется возможным этот процесс контролировать. В связи с этим целесообразно создание адекватных модельных систем, максимально приближенных к условиям *in vivo*, которые позволят не только с легкостью детектировать процессы клеточной миграции, дифференцировки и гибели клеток на любых сроках после трансплантации, но и вносить коррективы в поведение трансплантируемых клеток. Одной из таких моделей является органотипическая эксплантационная культура сетчатки глаза крысы. При данном типе культивирования удастся получить образцы,

длительное время сохраняющие исходную цитоархитектонику и клеточный состав *in vitro* [2].

Наиболее удачной экспериментальной моделью повреждения сетчатки глаза представляется индуцированное лазером локальное повреждение эксплантата сетчатки в системе *in vitro*. Такой подход позволяет наносить строго дозированные повреждения, т.е. получать воспроизводимые результаты во всей серии экспериментов. Ввиду возможности независимого контроля различных параметров лазерного излучения его применение в экспериментальных работах по моделированию повреждения нейрональных сетей представляется чрезвычайно перспективным и удобным.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение культур сетчатки

Для получения эксплантационной культуры сетчатки глаза использовали 4-дневных самцов крыс Wistar. Вскрытие глазного яблока проводилось по модифицированному протоколу [3]. После выделения сетчатку помещали на поверхность чашки Петри диаметром 35 мм таким образом, чтобы слой фоторецепторов находился сверху.

Культивирование проводили в стандартных условиях (+37 °С, 5% CO₂, 98% влажности) в течение 30 дней в среде DMEM/F12 (НПП «ПанЭко», C420/C600), содержащей глутамин («Sigma», G-8540) и инсулин-трансферрин-селенит в разведении 1 : 50 (НПП «ПанЭко», Ф-065), с добавлением сыворотки FCS™ 5% («HyClone», SH30109.03), основного фактора роста фибробластов (10 нг/мл, «Sigma», F0291) и эпидермального фактора роста (10 нг/мл, «Sigma», E9644), гепарина, гентамицина в концентрации 5 мкл/мл («Sigma», G1264), добавки N2 в разведении 1 : 100 («Gibco», 17502-048) и B27 в разведении 1 : 50 («Gibco», 17504044).

Повреждение эксплантата

В качестве повреждающего фактора использовали инфракрасный лазер (1480 нм) Zilos-tk™ («Hamilton Thorne») миллисекундного диапазона мощностью 300 мВ, нагревающий поверхность в области фокуса до 150 °С. Для повреждения выбирали квадрат со стороной 100 мкм средней зоны разрастания края эксплантата. Сетчатку повреждали 15 импульсами лазера длительностью 1000–3000 мс на 14-е сутки культивирования эксплантатов.

Трансплантация клеток

Для получения культуры ММСК использовали красный костный мозг EGFP+ мышей линии C57BL/6-Tg(АСТВ-EGFP)/Osб/J в возрасте 1 мес.

Непосредственно после умерщвления производили забор красного костного мозга из большеберцовых и бедренных костей животного по стандартному протоколу [4]. Строму костного мозга извлекали, промывая полость кости инсулиновым шприцем, заполненным средой DMEM с добавлением антибиотиков. Полученную суспензию центрифугировали в течение 7 мин при 1000 g, после чего супернатант сливали, осадок ресуспендировали и разводили средой для культивирования до плотности 1 × 10⁵ клеток/мл. Первичную суспензионную культуру клеток стромы костного мозга помещали на чашки для культивирования диаметром 60 мм и через 1 сут пассировали в очень низкой плотности – 1–5 клеток в поле зрения при увеличении x200 и культивировали до образования колоний.

Для получения культуры НСПК использовали материал субвентрикулярной зоны головного мозга 14-суточных эмбрионов мышей линии C57BL/6-Tg(АСТВ-EGFP)/Osб/J. После освобождения от мозговых оболочек головной мозг помещали в среду DMEM с антибиотиками, механически дезагрегировали с помощью пипетки до получения однородной суспензии клеток и центрифугировали в течение 5 мин при 1000 g. Супернатант сливали, осадок ресуспендировали в среде культивирования в концентрации 1 × 10⁶–2 × 10⁶ клеток/см². Клетки выращивали в культуре нейроэпителиального пласта.

Инъекцию клеток проводили стеклянным микрокапилляром на инвертированном микроскопе Nikon TE2000S, укомплектованном гидравлическими микроманипуляторами и инъекторами Narishige (ММО-202ND, IM-9B, IM-H1, Narishige HD-21), в зону разрастания клеток эксплантата в объеме культуральной среды 0.1 мкл на расстоянии 100, 1000 и 3000 мкм от зоны повреждения. Для оценки эффективности применимых в клинике протоколов трансплантации клеток в сетчатку глаза, имитирующих супрахориоидальную инъекцию, применяли метод нанесения суспензии трансплантируемых клеток на внешнюю (фоторецепторную) поверхность эксплантата при помощи микроинъектора в объеме среды не более 5 мкл.

Иммуногистохимический анализ

Иммуногистохимический анализ дифференцировки трансплантированных клеток проводили, выявляя маркеры нейрональной и глиальной дифференцировки: β-III-тубулин – с помощью антитела против изоформы βIII тубулина (anti-tubulin, beta III isoform antibody, «Chemicon», МАВ1637) и глиальный кислый фибриллярный белок – GFAP с помощью антитела против кислого фибриллярного глиального белка (anti-glia fibrillary acidic protein, «Sigma», G9269)

соответственно; оценивали также экспрессию маркера развивающихся нейритов GP-45 – с помощью антитела против регулируемого G-белком индуктора роста отростков нейритов 2 (G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 2 antibody, «Abcam», ab110898) и маркера клеток эндотелия капилляров GSL-IB4 – изолектина *Griffonia simplicifolia* IB4 («Sigma», L1509).

Получение изображений клеток

Прижизненные фотографии клеток получали с помощью инвертированного микроскопа Nikon TE2000S, флуоресцентные изображения – с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 25. Пространственную картину распределения трансплантированных клеток в эксплантате получали с использованием лазерной сканирующей конфокальной микроскопии (микроскоп Axiovert 200LSM 510Meta «Carl Zeiss»).

Статистический анализ

Анализ достоверности полученных результатов и статистическую обработку проводили при помощи программы STATISTICA 6.0. Наличие и достоверность различий между выборочными величинами независимых выборок оценивали при помощи непараметрического H-критерия Крускала–Уоллиса. Статистическую значимость отличий между группами инъекцированных клеток (ММСК, НСПК) определяли при помощи метода Стьюдента–Ньюмана–Келса (ANOVA).

Атомно-силовая микроскопия (АСМ)

АСМ-изображения получены на атомно-силовом микроскопе Solver BIO Olympus (НТ-МДТ, Россия) с полем сканирования 100 x 100 x 7 мкм³ и системой емкостных датчиков и кантилевера Veeco MSCT-AUHW («Veeco Instruments», США) жесткостью 0.01–0.03 Н/м. Для регистрации изгиба кантилевера использовали лазер с длиной волны 650 нм. С помощью совмещенного с прибором инвертированного оптического микроскопа осуществляли подвод кантилевера к образцу и устанавливали места сканирования. Изображения обрабатывали средствами программы Nova (НТ-МДТ, Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первым этапом нашей работы было получение долгосрочно переживающих *in vitro* органотипических эксплантационных культур сетчатки глаза. На протяжении всего времени культивирования (до 30 сут) сохранялась цитоархитектоника ткани, в ее составе присутствовали основные типы клеток, характерные для интактной сетчатки *in vivo* [5] (рис. 1). Таким об-

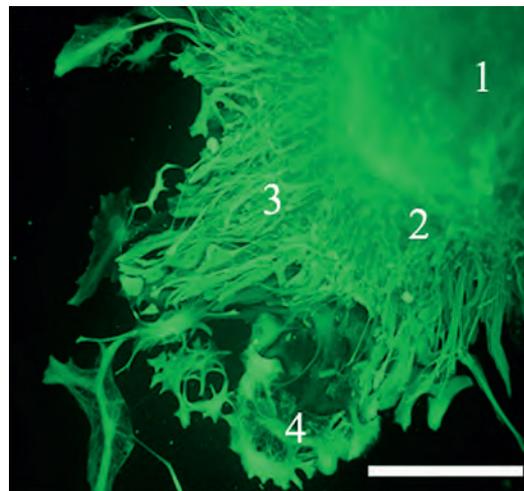


Рис. 1. Миграция клеток из эксплантата сетчатки (1) с образованием многоклеточной ближней (2), средней (3) и монослойной дальней (4) зоны разрастания края эксплантата. Масштабный отрезок 300 мкм.

разом, данная эксплантационная культура представляет собой адекватную модель развивающейся нейросетчатки, которая позволяет сохранить микроокружение входящих в ее состав нервных клеток.

При повреждении лазерным импульсом отчетливо изменялась макроструктура ткани в области фокуса луча, что сопровождалось потемнением цитоплазмы клеток, их интенсивной вакуоляризацией и коагуляцией межклеточного матрикса. Наблюдался отсроченный эффект лазерного облучения в виде массовой клеточной гибели в зоне повреждения эксплантата сетчатки на 2–3-и сутки после нанесения травмы. Вокруг непосредственной зоны воздействия лазера (100 x 100 мкм) формировалась зона массовой клеточной гибели радиусом до 500 мкм. Таким образом, лазерное повреждение было легко визуализируемым, проявлялось в существенной реорганизации межклеточного матрикса (коагуляции), приводило к утрате клеточных взаимосвязей и изменению морфологии клеток, завершалось их гибелью и носило необратимый характер.

Для моделирования процессов восстановления поврежденной области сетчатки после воздействия лазера в среднюю зону расселения клеток эксплантата инъекцировали НСПК и ММСК EGFP+ мышей. Оказавшись в новом микроокружении, трансплантированные клетки активно мигрировали и изменяли свою морфологию, выпуская длинные ветвящиеся отростки и приобретая фенотип, характерный для нейронов.

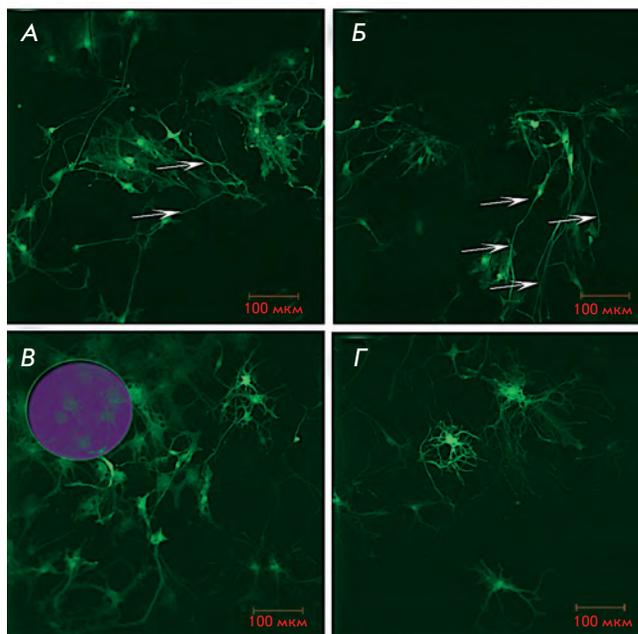


Рис. 2. Направленный таксис НСПК к зоне лазерного повреждения эксплантата сетчатки глаза. А, Б — Образование и распространение нейритов (указаны стрелкой), трансплантированными EGFP+–клетками по направлению вектора от места инъекции к области лазерного повреждения сетчатки. В, Г — Локализация трансплантированных НСПК в зоне лазерного повреждения сетчатки на 7 сутки после инъекции и образование ими густой сети нейритов на 14 сутки.

Было проанализировано распределение EGFP+–клеток относительно зоны поражения и зоны инъекции по вектору их миграции в течение первых 24 ч, а также на третьи и седьмые сутки после трансплантации. При сравнении распределения EGFP+–клеток было установлено, что наиболее активно клетки мигрируют от места трансплантации к области повреждения (рис. 2А,Б). Ежедневная регистрация миграции клеток методом конфокальной микроскопии показала, что наиболее активно она происходила в первые 24 ч и значительно снижалась по мере их морфологической дифференцировки на третьи сутки после инъекции. Первые клетки, пришедшие в зону воздействия лазера, детектировали спустя 1 ч после трансплантации при введении их на расстоянии 100 мкм, через 12 ч — при инъекции на удалении на 500 мкм и через 3–5 сут — при трансплантации более чем в 1000 мкм от места повреждения. Наиболее активное привлечение клеток в поврежденную область происходило на протяжении первых 3 сут после создания дефекта сетчатки и резко угасало в дальнейшем. Было показано, что в течение 3 сут после трансплан-

тации инъецированные клетки активно мигрировали на расстояния, превышающие 1000 мкм от места введения, причем клетки перемещались в направлении области повреждения. Инъецированные клетки распространялись в эксплантате вдоль вектора, направленного к области травмы, на расстояние 5 мм, а в противоположном направлении не более 1 мм (рис. 2В,Г). Статистическая обработка результатов подсчета EGFP+–НСПК в одном поле зрения в зоне повреждения и на таком же расстоянии по вектору, проходящему через место инъекции, показала значимо большее ($p < 0.01$) количество трансплантированных клеток в области (рис. 3).

В контрольных эксплантатах, подвергнутых точечной трансплантации без лазерного повреждения, распространение инъецированных клеток было однородным по всем направлениям с превалированием миграции от центра эксплантата по миграционным путям выселяющихся из него клеток. Таким образом, показана неоднородность распределения трансплантированных НСПК относительно места введения при нанесении повреждения лазером — наличие таксиса, направленного к зоне дефекта. Аналогичные результаты по изменению поведения инъецированных клеток в нейрональном микроокружении получены при трансплантации НСПК *in vivo* [6].

При достижении зоны повреждения миграция клеток прекращалась, наблюдалось образование ими асинаптических дендритов, распространяющихся во всех плоскостях, и агрегация трансплантированных клеток друг с другом. Пришедшие в поврежденную область клетки оставались в ней на протяжении всего эксперимента (до 30 сут после трансплантации) и полностью утрачивали миграционную активность, образуя густую сеть нейритов.

Существенное влияние на поведение трансплантированных клеток оказывала их концентрация при трансплантации. Введение в эксплантат единичных клеток приводило к быстрой остановке их передвижения внутри сетчатки и сопровождалось слабой морфологической дифференцировкой. Единичные НСПК приобретали глиальный фенотип и обладали маркерами глиальной дифференцировки — GFAP, начиная с 5 суток после трансплантации. Единичные ММСК не сохранялись в эксплантате дольше суток. При трансплантации 50–100 клеток их миграционная активность была подавлена, они образовывали ассоциаты, их таксис был направлен друг к другу, и лишь единичные клетки мигрировали на значительные расстояния. Иная картина наблюдалась при трансплантации более 1000 клеток. В этом случае большинство клеток активно перемещалось к области повреждения, где они образовывали длинные нейриты, служащие для перемещения других клеток. Быстрее

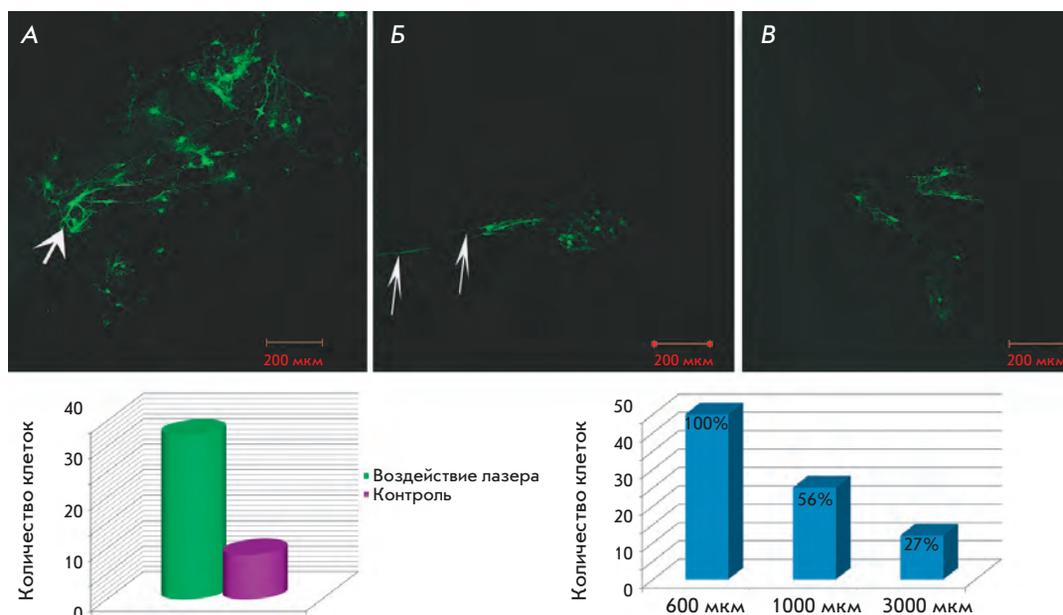


Рис. 3. Миграция трансплантированных НСПК в зоны повреждения, удаленные на 600 (А), 1000 (Б), 3000 мкм (В) от области инъекции. Диаграммы количественных отличий между миграцией клеток в поврежденном и intactном эксплантате и гистограмма процентного соотношения количества клеток в различно удаленных от места инъекции зонах повреждения.

(по сравнению с intactным эксплантатом) происходила и дифференцировка НСПК с преобладанием нейрональной составляющей и экспрессией трансплантированными клетками β -III-тубулина и GP-45. В составе эксплантата инъецированные клетки не только сохраняли жизнеспособность на протяжении более 2 мес, но и активно пролиферировали.

При исследовании распределения трансплантированных НСПК в эксплантате с несколькими последовательно расположенными зонами лазерного повреждения, находящимися на различном расстоянии от места инъекции (600, 1000 и 3000 мкм), было показано заселение трансплантированными клетками всех зон повреждения в течение 7 сут после инъекции (рис. 3). Однако было отмечено уменьшение количества клеток в зонах повреждения по мере их удаления от области введения. Так, в зоне повреждения, удаленной на 1000 мкм от места трансплантации, находилось 56% клеток, зарегистрированных в зоне, удаленной на 600 мкм, а в зоне, удаленной на 3000 мкм – всего 27%.

Для трансплантации ММСК и НСПК применили два метода введения: непосредственную инъекцию в глубь средней зоны края разрастания эксплантата и поверхностное нанесение клеток. В первом случае трансплантированные клетки непосредственно контактировали с нейрональной составляющей, во втором имитировалась супрахориоидальная инъекция *in vivo*. При нанесении НСПК на поверхность эксплантата сетчатки наблюдалось практически полное отсутствие их миграционной активности и процессов нейрональной дифференцировки (негативное окра-

шивание на β -III-тубулин). Это наблюдение позволяет объяснить незначительный терапевтический эффект трансплантированных НСПК в клинической практике при супрахориоидальной или ретробульбарной инъекции [7]. При инъекции НСПК в глубь слоев нейросетчатки трансплантированные клетки активно мигрировали и изменяли свою морфологию, выпускали длинные ветвящиеся отростки, приобретали фенотип, характерный для нейронов, положительно окрашивались на β -III-тубулин и GP-45.

При внесении ММСК обоими методами наблюдали быструю миграцию отдельных клеток небольшого диаметра (10–15 мкм), образование ими длинных нейритоподобных выростов и ламеллоподий. Таким образом, происходила морфологическая дифференцировка трансплантируемых клеток согласно их новому микроокружению, с приобретением ими фенотипа нейральных клеток (рис. 4). При трансплантации более 500 клеток наблюдалась сохранность ММСК в составе эксплантата в течение 30 сут. Трансплантированные ММСК приобретали два характерных фенотипа: нейрональный – с длинными тонкими ветвящимися отростками, имеющими ампулярные расширения, и оформленным компактным телом клетки, и глиальный – с ламеллоподиальными выростами цитоплазмы и крупным ядром с хорошо различимыми ядрышками. Нейритоподобные выросты ММСК проникали в глубь эксплантата сетчатки, образовывали анастомозы и контактировали с другими трансплантированными клетками и нейронами самого эксплантата, т.е. поведение трансплантированных в микроокружение нейросетчатки ММСК

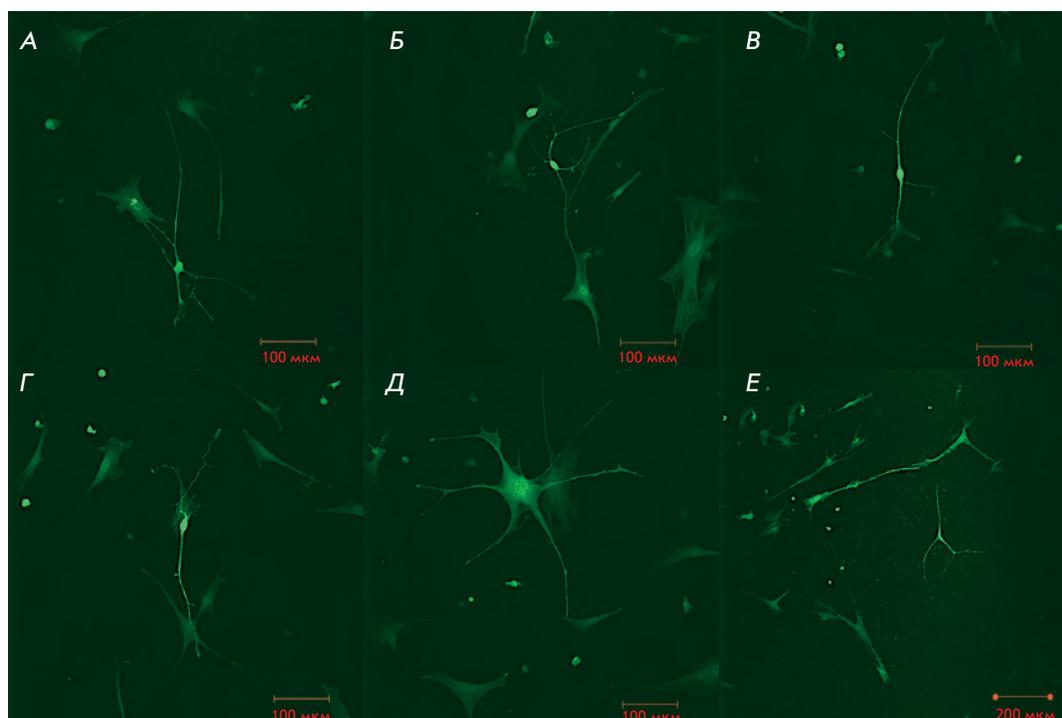


Рис. 4. Изменение морфологии трансплантированными ММСК в эксплантатах сетчатки, поврежденных лазерным излучением. А–Г – Приобретение нейрональной морфологии инъецированными ММСК. Д, Е – Дифференцировка инъецированных ММСК по глиальному фенотипу.

было сходным с поведением инъецированных НСПК. Однако, в отличие от НСПК, способ введения ММСК не влиял на активность миграции трансплантированных клеток. Как при нанесении на поверхность, так и при инъекции в глубь эксплантата ММСК мигрировали по всем направлениям от места введения в течение первых суток. С началом дифференцировки клеток их миграция останавливалась, что позволяет говорить о важности первых часов после трансплантации для миграции введенных клеток, занятии ими новых ниш, пролиферации и дифференцировки с последующей возможностью репарации дефектов [8].

При повреждении эксплантата морфология ММСК изменялась быстрее по сравнению с клетками, введенными в контрольные образцы, не подвергнутые воздействию лазера. В данной серии экспериментов морфологические изменения ММСК появлялись спустя 24 ч после инъекции, в то время как в контроле – лишь через 3 сут. Эти данные позволяют предположить, что для морфологической дифференцировки трансплантированных клеток, отвечающей условиям их нового микроокружения, чрезвычайно важны регуляторные факторы, высвобождающиеся при гибели клеток в районе нанесения повреждения.

При помощи атомно-силовой микроскопии показано морфологическое преобразование трансплантированных ММСК в клетки с нейрональным фенотипом, их активная миграция до 3 сут после инъекции

и образование биполярных и мультиполярных нейритоподобных отростков. Выселению клеток из эксплантата сетчатки предшествовало образование ламеллоподиальных выростов. При помощи АСМ удалось измерить высоты данных отростков и изучить их пространственное распределение, а также оценить шероховатость их поверхности. По данным АСМ, средняя длина первичных ламеллоподий мигрирующих клеток составила 10.1 ± 2.0 мкм, а их средний диаметр – 3.6 ± 0.5 мкм. К 7 сут культивирования наблюдалось увеличение протяженности асинаптических дендритов, выпускаемых расселяющимися клетками эксплантата сетчатки. По данным АСМ, их средняя длина составила 21.7 ± 5.0 мкм, средний диаметр – 0.8 ± 0.23 мкм. По поверхности глиальных (GFAP-иммунопозитивных) и эндотелиальных (GSL-IB4-иммунопозитивных, GFAP-иммунонегативных) клеток происходило распространение нейритоподобных отростков ММСК, которые достигали нескольких мм в длину и до 0.47 мкм в диаметре (рис. 5А,Б).

Количественный анализ распределения высот отростков между группами глиеподобных клеток и нейритоподобных ММСК выявил значимое отличие ($p < 0.01$) в высоте отростков, формируемых глиальными и эндотелиальными компонентами сетчатки, и отростков нейронов и трансплантированных ММСК (рис. 5Д). Показано отсутствие статистически значимых отличий ($p = 0.52$) в средней квадратичной

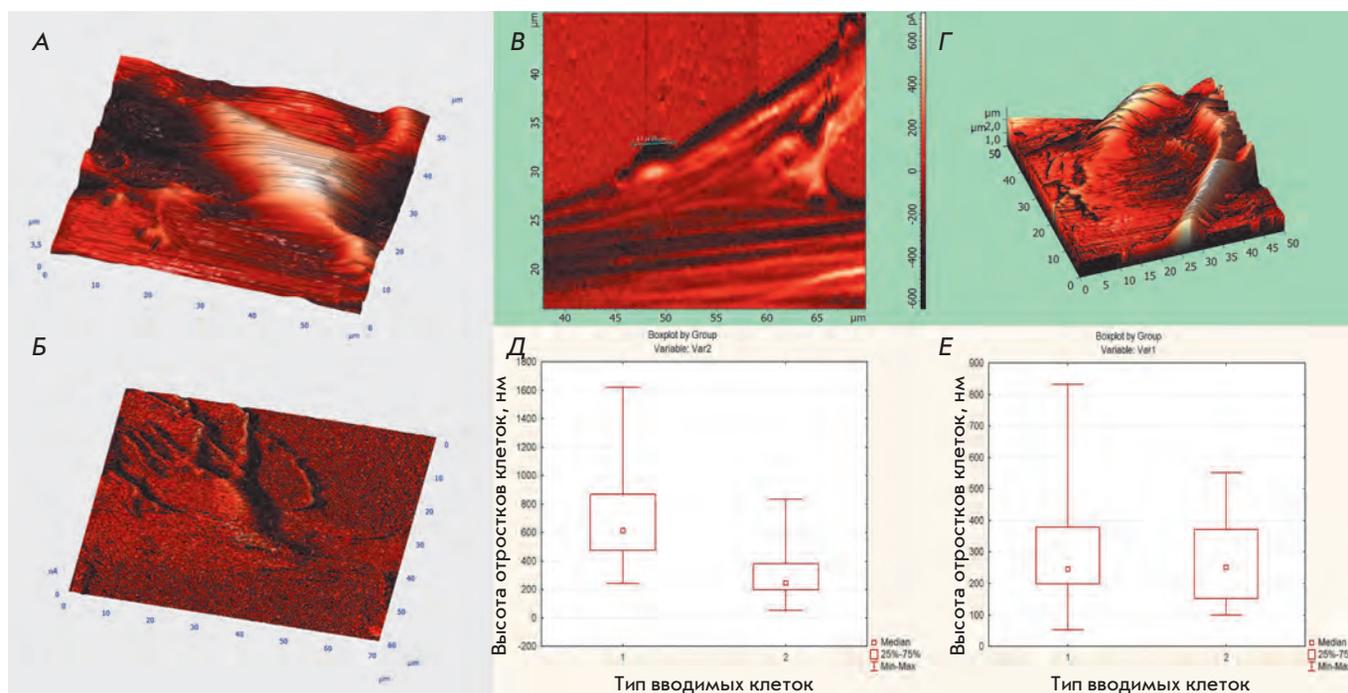


Рис. 5. АСМ-анализ поверхности инъекцированных ММСК, проводимый в контактном и полуконтактном режимах. А – Реконструкция поверхности ММСК, изменившей свою морфологию. Б – Начало выселения клеток из эксплантата, образование ламеллоподий. В, Г – Образование синаптических контактов между трансплантированными ММСК и клетками сетчатки. Д – Количественный анализ распределения высот отростков – 1 группа – глиальные клетки эксплантата сетчатки, 2 группа – отростки трансплантированных ММСК ($p < 0.01$). Е – Количественный анализ распределения высот отростков – 1 группа – нейрональные клетки эксплантата сетчатки, 2 группа – отростки трансплантированных ММСК ($p > 0.01$).

шероховатости поверхности трансплантированных ММСК, морфология которых изменилась на нейроноподобную, и нейронов сетчатки, а также отсутствие статистически значимых отличий ($p = 0.26$) при сравнении асимметрии распределения отростков трансплантированных клеток и нейронов эксплантата сетчатки (рис. 5Е). При исследовании изображений поверхности клеток не удалось выявить статистически значимых различий в размахе высот отростков между ММСК и нейронами сетчатки, при наличии статистически значимых различий ($p < 0.01$) высот отростков ММСК с высотами отростков глиальных и эндотелиальных клеток сетчатки. Получены АСМ-изображения синаптических расширений, формируемых трансплантированными ММСК, на концах нейритоподобных выростов (рис. 5В). Также изучено взаимодействие между такими синапсами и клетками эксплантата. Морфометрические параметры синапсов между трансплантированными ММСК и нейронами сетчатки не отличались от параметров между трансплантированными НСПК и клетками реципиента.

С применением красителя Di-I, которым окрашивали клетки эксплантата сетчатки, показано, что слияние трансплантированных EGFP+ ММСК и клеток сетчатки не происходило, так как отсутствовали клетки, несущие обе метки.

В результате полученных данных можно предположить, что для наиболее эффективного восстановления повреждения сетчатой оболочки глаза при помощи клеточной трансплантации оптимально использовать НСПК, вводимые непосредственно в состав нейросетчатки. Их приближенной и доступной альтернативой можно считать ММСК, способные запускать и поддерживать репарационные процессы в ткани реципиента, а также вставать на путь нейрональной дифференцировки [9]. Однако вопрос о функциональном замещении утраченных нервных клеток трансплантированными ММСК и их потомками все еще остается открытым.

ВЫВОДЫ

Полученные эксплантационные культуры сетчатки эквивалентны нейросетчатке *in vivo*.

При инъекции ММСК и НСПК наблюдается их активная миграция в первые часы после трансплантации, идущая с различной скоростью при их инъекции в глубь слоев нейросетчатки и при поверхностном нанесении на эксплантат.

Определяющим фактором для дифференцировки трансплантированных клеток является микроокружение, в которое попадают вносимые клетки, в некоторых случаях возможно приобретение нейронального фенотипа трансплантированными в нейросетчатку ММСК.

При помощи лазерной установки получена возможность контролировать нанесение повреждений сетчатки *in vitro*, которое стимулирует миграционную активность трансплантированных клеток в направлении области травмы и ускоряет их дифференцировку согласно занимаемой нише. ●

Работа выполнена при реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы (№ П113).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bull N.D., Martin K.R. // *Regenerative Medicine*. 2009. V. 4. № 6. P. 855–865.
2. Johansson K., Ehinger B. // *Vision Res*. 2005. V. 45. P. 3235–3243.
3. Kretz A., Hermening S.H., Isenmann S. // *J. Neurosci. Methods*. 2004. V. 136. P. 207–219.
4. Schrepfer S., Deuse T., Lange C., Katzenberg R., Reichen-spurner H., Robbins R.C., Pelletier M.P. // *Stem Cells Dev*. 2007. V. 1. P. 105–107.
5. Семенова М.Л., Сергеев С.А., Сабурина И.Н., Кошелева Н.В. // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2010. № 2. С. 55–61.
6. Александрова М.А., Подгорный О.В., Марей М.В., Полтавцева Р.А., Цитрин Е.Б., Гуляев Д.В., Черкасова Л.В., Ревещин А.В., Корочкин Л.И., Сухих Г.Т. // *Клеточные технологии в биологии и медицине*. 2005. № 1. С. 13–19.
7. Сергеев С.А., Павлова Г.В., Тахчиди Х.П., Гаврилова Н.А., Ревещин А.В., Сабурина И.Н., Ланевская Н.И., Иванова З.Г., Бастаков В.А., Комова О.Ю., и др. // *Офтальмохирургия*. 2010. № 3. С. 33–38.
8. Blong C.C., Jeon C.J., Yeo J.Y., Ye E.A., Oh J., Callahan J.M., Law W.D., Mallapragada S.K., Sakaguchi D.S. // *J. Neurosci. Res*. 2010. V. 88. P. 1445–1456.
9. Lei Z., Yongda L., Jun M., Yingyu S., Shaoju Z., Xinwen Z., Mingxue Z. // *Cell Biol. Internat*. 2007. V. 31. P. 916–923.

УДК 576.315.42

Новый вирусный вектор для суперпродукции эпитопов вакцинных белков в растениях

Л. Г. Тюлькина¹, Е. В. Скурят¹, О. Ю. Фролова², Т. В. Комарова², Е. М. Каргер²,
И. Г. Атабеков^{1*}

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

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

*E-mail: atabekov@genebee.msu.su

Поступила в редакцию 20.06.2011 г.

РЕФЕРАТ На основе геномов потексвирусов – генома Х-вируса картофеля (ХВК) и гена капсидного белка вируса мозаики альтернантеры (КБ ВМАльт), сконструированы гибридные вирусные векторы ХВК-КБ ВМАльт и ХВКdt-КБ ВМАльт, обеспечивающие высокий уровень накопления капсидного белка. Система экспрессии на основе векторов ХВК-КБ ВМАльт и ХВКdt-КБ ВМАльт генетически безопасна, так как у гибридных вирусов нарушен системный транспорт и образование инфекционных вирусных частиц. КБ ВМАльт, формирующий вирусоподобные частицы (ВПЧ) в отсутствие геномной РНК, может служить платформой для эффективной презентации чужеродных эпитопов (включая эпитопы патогенов человека). В качестве модельного гетерологичного пептида при создании химерного КБ ВМАльт мы использовали N-концевой домен белка М2 (М2е) вируса гриппа А человека и его укороченный ΔМ2е-вариант. Химерные капсидные белки ВМАльт с эпитопами белка М2 вируса гриппа А также способны формировать на основе самосборки протяженные ВПЧ. В процессе накопления, полимеризации и выделения химерных ВПЧ эпитопы белка М2 вируса гриппа А не элиминируются, что свидетельствует о стабильности химерного КБ ВМАльт при С-концевой локализации чужеродного эпитопа. Таким образом, гибридный вирусный вектор ХВК-КБ ВМАльт может использоваться в биотехнологии для продукции вирусоподобных наноразмерных частиц, представляющих на своей поверхности эпитопы вакцинных белков. Химерные ВПЧ, несущие на поверхности чужеродные эпитопы, можно рассматривать как потенциальные вакцины.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА потексвирусы, вирусный вектор, чужеродный эпитоп, химерные вирусоподобные частицы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ХВК – Х-вирус картофеля; ВМАльт – вирус мозаики альтернантеры; КБ – капсидный белок; dt – делеция генов транспорта; ХВК-КБ ВМАльт – гибридный вирусный вектор на основе генома ХВК с КБ ВМАльт; М2е – эктодомен белка М2 вируса гриппа А; ΔМ2е – укороченный вариант М2е; КБ-М2е ВМАльт, КБ-ΔМ2е ВМАльт – химерные КБ ВМАльт с эпитопом белка М2; ВПЧ – вирусоподобные частицы; ПЦР – полимеразная цепная реакция; НТО – нетранслируемая область.

ВВЕДЕНИЕ

Использование растений с целью экспрессии и накопления чужеродных (целевых) белков (ЦБ), применяемых в медицине, ветеринарии, сельском хозяйстве и промышленности, – одно из перспективных направлений биотехнологии.

Преимущество растений перед клетками животных или микроорганизмов состоит в технологической простоте и возможности одновременного производства большого количества недорогого целевого продукта, а отсутствие патогенов, общих для человека и растений, делает произведенные в растениях бел-

ки полностью безопасными. Наличие в растениях систем посттрансляционных модификаций обычно обеспечивает формирование правильной конформации целевых белков при помощи дисульфидных связей и гликозилирования.

Один из наиболее эффективных методов быстрого получения в растениях значительных количеств целевого белка основан на использовании автономно реплицирующихся рекомбинантных вирусных векторов. Высокая скорость репликации вирусных геномов обеспечивает высокую копияность транскриптов чужеродных генов в цитоплазме инфицированных

клеток. Поэтому продуктивность вирусной системы экспрессии в среднем на два порядка выше, чем при стабильной трансформации растений или транзientной экспрессии с помощью невирусных векторов [1, 2]. Наиболее широко используются вирусные векторы, созданные на основе РНК-содержащих вирусов растений (тобамо-, потекс-, комо-, бромо- и потивирусов) [3].

Существуют две основные стратегии получения целевых белков при использовании вирусного вектора:

1) ген ЦБ под контролем вирусного промотора экспрессируется с образованием индивидуального белка. Это может быть выполнено на основе «стратегии добавления гена», когда ген ЦБ помещают под контроль дублированного субгеномного промотора, например, гена белка оболочки [2, 4–6], или «стратегии замены гена», когда вирусный ген (чаще всего ген белка оболочки или/и гены межклеточного транспорта) заменены геном ЦБ [7–11]. Такой подход позволяет за короткое время накапливать целевой белок в количествах, достигающих 10% и более от суммарного растворимого белка растений. Векторы на основе геномов фитовирусов успешно применяются для продукции в растениях белков медицинского назначения, в том числе вакцинных. Эту стратегию использовали для синтеза сердцевинного белка вируса гепатита В (НВсAg) и капсидного белка калицивируса, способных формировать стабильные вирусоподобные частицы, стимулирующие гуморальный и клеточный иммунные ответы [12, 13];

2) стратегия «слияния» нуклеотидной последовательности гена ЦБ или его фрагмента с вирусным геном или его фрагментом. Чаще всего вирусный ген капсидного белка и ген ЦБ экспрессируются как единая рамка трансляции. Но существуют ограничения на допустимый размер добавленной чужеродной последовательности. Протяженные полипептиды, как правило, соединяют с основным белком через гибкий мостик, сайты протеолиза, через последовательность пептида 2А вируса ящура или иным способом [14–17].

Изучение молекулярных механизмов активации адаптивного иммунного ответа свидетельствует о том, что скорее пептиды, нежели целые белки отвечают за активацию Т- и В-лимфоцитов [18]. Пептиды (как синтетические, так и рекомбинантные) нестабильны и обладают слабой антигенной активностью [19], однако усиление их иммуногенности и повышение стабильности происходят после связывания с высокомолекулярными и высокоиммуногенными носителями [18].

Примером таких носителей могут быть капсидные белки (КБ) вирусов растений, способные формировать вирусные и/или вирусоподобные наночастицы

и служить платформой для презентации эпитопов патогена. Подобные наночастицы имеют стабильную и регулярно повторяющуюся структуру, которая способствует индукции сильного как клеточного, так и гуморального иммунного ответа [20–23].

Используя данную стратегию экспрессии, созданы вирусные векторы, продуцирующие в растениях вирусы с химерным КБ. На поверхности этих вирионов были презентируемы эпитопы антигенов золотистого стафилококка, вирусов ящура, гепатита С, папилломы, полиомиелита, вируса иммунодефицита человека, вируса гриппа [24–33] и многих других (см. также обзоры [3, 34]).

Но вирусные векторы на основе полноразмерных геномов, способных к системному транспорту и образованию инфекционных вирусных частиц, небезопасны для использования в биотехнологии. В процессе производства целевых белков нельзя исключить возможность попадания рекомбинантных вирусов в окружающую среду с последующим неконтролируемым распространением генетического материала.

Капсидные белки некоторых вирусов животных и растений сохраняют способность формировать стабильные капсиды, вирусоподобные частицы (ВПЧ) в отсутствие вирусного генома. Использование ВПЧ в качестве платформы для эффективной презентации чужеродных для иммунной системы эпитопов [21, 35–37] может решить проблему биобезопасности производства вакцинных белков. В настоящее время особое внимание уделяется конструированию векторных систем, экспрессирующих капсидные белки, которые формируют ВПЧ, свободные от каких-либо примесей РНК. Считается, что только такие ВПЧ могут использоваться в биотехнологии и нанотехнологии [38, 39].

Цель настоящей работы – создание системы генетически безопасных вирусных векторов на основе геномов потексвирусов для продукции в растениях ВПЧ, презентирующих на своей поверхности эпитопы патогена.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Среды, реактивы, ферменты и синтетические олигонуклеотиды

В работе использовали *Escherichia coli* XL-1 Blue («Stratagene», США) и *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 из коллекции кафедры вирусологии МГУ. Рекомбинантные ДНК клонировали в клетках *E. coli* XL-1 Blue стандартными методами [40] с использованием рестрикционных эндонуклеаз, ДНК-лигазы, Taq- и Pfu-полимераз («Fermentas», Литва и «СибЭнзим-М», Россия). Олигонуклеотиды были синтезированы фирмой «Синтол» (Россия).

Для клонирования использовали следующие синтетические олигонуклеотиды: ВМАльт-КБ-XhoI-p (CTAGCTCGAGATGTCCACTCCATTTCTCAAA), ВМАльт-КБ-XbaI-m (CGTCTAGATTACTSCGGTGGTGGGAGGTATTGA), PVX-R-Avr2-p (TGCACAGATTTTCTAGGCAC), PVX-R-XhoI-m (AGCTCTCGAGCTTATTCAAATCTCTAAGGTA), PVX-3ntr-XbaI-p (AGCTTCTAGACTACGTC-TACA TAACCGACGC), Oligo(dT)₂₄-Kpn-m (AGCTGGTACSTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT T), PVX-Kpn-(dT)₁₂-3ntr-m (AGCTGGTACC-TTTTTTTTTTTATATTATTCATACAATC), PVX-Xba-cpxho-3ntr-p (AGTCTCTAGTCGAGGCGT-TCAGGAACA), ВМАльт-КБ-evetpirn-XbaI-m (CGTCTAGATTAGTTTCTGATGGTGTTCAC-CCSTCCGGTGGTGGGAGGTA), ВМАльт-КБ-M2E-m (TTTCCACSTCTGTCAAGAGT-GACTCCGGTGGTGGGAGGTA), M2E-XbaI-m (CGTCTAGATTAGTCGGATGAGTCGTTGCATCT), M2E-p (TCACTCTTGACAGAGGTGGAACAC-CAATCAGAAACGAGTGGG), M2E-m (GTCGGAT-GAGTCGTTGCATCTGCATCCCCACTCGTTTCT-GATT). Правильность полученных конструкций подтверждали путем автоматического секвенирования препаратов плазмидных ДНК в фирме «ГеноТехнология» (Россия).

Векторные конструкции ХВК-КБ ВМАльт и ХВКdt-КБ ВМАльт

Бинарные гибридные векторы получали в несколько стадий с использованием промежуточных конструкций (ПК).

ПК 1 – Фрагмент плазмиды PVX-201, содержащий 35S промотор, репликон ХВК с дублированным субгеномным промотором, но без терминатора транскрипции гена нопаинсинтазы (Tnos-терминатор), по сайтам HindIII/EcoRI был перенесен в бинарный вектор pBIN 19.

ПК 2 – Ген капсидного белка ВМАльт получен методом ПЦР на матрице кДНК-копии 3'-концевой области геномной РНК ВМАльт с использованием пары праймеров ВМАльт-КБ-XhoI-p и ВМАльт-КБ-XbaI-m и субклонирован в вектор Cambia 6963 по сайтам рестрикции XhoI/XbaI.

ПК 3 – Для удобства клонирования сайт рестрикции XbaI, фланкирующий субгеномный промотор белка 25 кДа ХВК, был заменен сайтом рестрикции XhoI. С этой целью фрагмент кДНК ХВК, кодирующий С-концевую область вирусной полимеразы, получен методом ПЦР на матрице PVX-201 с использованием пары праймеров – PVX-R-Avr2-p и PVX-R-XhoI-m. Синтезированный фрагмент клонировали по сайтам Avr2/XhoI в вектор pGEM3-11369(polio)x2, содержащий субгеномный промотор

гена белка 25 кДа, последовательность, кодирующую С-концевую часть полимеразы ХВК и КБ U1 вируса табачной мозаики (ВТМ) с удвоенным полиовирусным эпитопом. Этой операцией из вектора pGEM3-11369(polio)x2 была удалена последовательность гена капсидного белка U1 ВТМ и создан сайт рестрикции XhoI на 3'-конце субгеномного промотора белка 25 кДа.

ПК 4 – Три варианта 3'-НТО получены с помощью ПЦР на матрице PVX-201 с использованием трех пар праймеров: PVX-3ntr-XbaI-p и Oligo(dT)₂₄-Kpn-m использовали для синтеза 3'-НТО ХВК (А)₂₄; праймеры PVX-3ntr-XbaI-p и PVX-Kpn-(dT)₁₂-3ntr-m – для синтеза 3'-НТО ХВК (А)₁₂; праймеры PVX-Xba-cpxho-3ntr-p и PVX-Kpn-(dT)₁₂-3ntr-m – для синтеза 3'-НТО ХВК p/cp (А)₁₂.

Синтезированные фрагменты ДНК, соответствующие различным вариантам 3'-НТО, после расщепления рестриктазами XbaI/KpnI одновременно с геном КБ ВМАльт, предварительно выщепленным из ПК 2 по сайтам XhoI/XbaI клонировали в плазмиду pBlue-Script II SK+ по сайтам XhoI-(XbaI)-KpnI.

ПК 5 – Фрагмент ДНК, соответствующий КБ ВМАльт с прилегающей 3'-НТО, выщепляли из ПК 4 по сайтам рестрикции XhoI/KpnI и одновременно с фрагментом ДНК, соответствующим Tnos-терминатору, и предварительно выщепленным по сайтам KpnI/SacI из содержащего Tnos-терминатор субклона pGEM, клонировали в ПК 3 по сайтам XhoI-(KpnI)-SacI.

На последнем этапе клонирования фрагмент ДНК из ПК 5 по сайтам XhoI/SacI или AvrI/SacI переносили в ПК 1, предварительно обработанную рестриктазами SalI/SacI или AvrI/SacI.

Получение векторных конструкций, экспрессирующих химерные капсидные белки ВМАльт

ПК 6 – Ген КБ ВМАльт, содержащий последовательность, кодирующую ΔM2e-вариант, получен методом ПЦР на матрице кДНК-копии 3'-концевой области геномной РНК ВМАльт с использованием пары праймеров – ВМАльт-КБ-XhoI-p и ВМАльт-КБ-evetpirn-XbaI-m, и субклонирован в вектор Cambia 6963 по сайтам рестрикции XhoI/XbaI. Ген КБ ВМАльт, кодирующий полноразмерный домен M2e получен методом ПЦР в три стадии с использованием пары синтетических олигонуклеотидов M2E-p и M2E-m и двух пар праймеров – ВМАльт-КБ-XhoI-p и ВМАльт-КБ-M2E-m, и ВМАльт-КБ-XhoI-p и M2E-XbaI-m, и субклонирован в вектор Cambia 6963 по сайтам рестрикции XhoI/XbaI.

ПК 7 – В ПК 5 по сайтам XhoI/XbaI последовательность вирусного капсидного белка заменяли

на последовательности химерных капсидных белков из ПК 6.

На последнем этапе клонирования фрагменты ДНК из ПК 7 по сайтам XhoI/SacI или AvrI/SacI переносили в ПК 1, предварительно обработанную рестриктазами SalI/SacI или AvrI/SacI.

Агроинъекция

Агробактерии *A. tumefaciens* (штамм GV3101) трансформировали рекомбинантными плазидами, используя метод «замораживания-оттаивания» [41]. Агробактерии, содержащие рекомбинантные бинарные векторы, выращивали в течение ночи на качалке при 28°C в среде LB, содержащей 50 мг/л рифампицина, 50 мг/л канамицина и 25 мг/л гентамицина. Клетки осаждали центрифугированием при 4000 g в течение 5 мин и ресуспендировали в буфере для агроинъекции, содержащем 10 mM Mes (pH 5.5) и 10 mM MgSO₄. Листья растений *Nicotiana benthamiana* инъецировали суспензией агробактерий ($OD_{600} = 0.2$) с помощью шприца без иглы. После агроинъекции растения выращивали под лампой дневного света при 16-часовом световом дне и 22°C. Для подавления посттранскрипционного умолкания генов агроинъекцию растений проводили в присутствии гена-супрессора p19 вируса кустистой карликовости томатов.

Анализ экспрессии капсидного белка ВМАльт при агроинъекции

Высечки из агроинъецированных листьев *N. benthamiana* гомогенизировали в трех-пяти объемах экстракционного буфера (10 mM Трис, pH 8.0, содержащего 5 mM EDTA). Полученную суспензию осветляли центрифугированием при 12000 g в течение 15 мин. К супернатанту добавляли равный объем денатурирующего буфера для нанесения на полиакриламидный гель (ПААГ). Буфер для нанесения проб на ПААГ содержит 60% глицерина, 20% β-меркаптоэтанола, 10% додецилсульфата натрия, 250 mM Трис-HCl-буфера, pH 6.8 и 1% бромфенолового синего. Анализируемые пробы прогревали при 95°C в течение 15 мин и фракционировали с помощью электрофореза в 12% ПААГ по методу Лэммли [42] с последующим окрашиванием Кумасси R-250. Синтезированные в листьях *N. benthamiana* химерные капсидные вирусные белки идентифицировали методом Вестерн-блоттинга, как описано ранее [43], с использованием поликлональных антител к КБ ВМАльт и/или М2е-эпистоу и вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена («Sigma»). Продукты реакции визуализировали методом хемилюминесценции с использованием системы ECL («Amersham Biosciences»).

Выделение капсидных белков ВМАльт из растительной ткани

На шестые-восьмые сутки после заражения листовой материал растирали до образования однородной суспензии в экстракционном буфере (10 mM Трис, pH 8.0, 5 mM EDTA). Полученную смесь центрифугировали при 12000 g в течение 15 мин и отбирали супернатант, в котором содержались капсидные белки. Для полимеризации КБ ВМАльт и образования ВПЧ к супернатанту добавляли 0.5 M цитратный буфер, pH 4.0, до концентрации 25 mM и инкубировали в течение 40 мин при комнатной температуре. Псевдовирioны из растительного экстракта осаждали ультрацентрифугированием при 100 000 g в течение 120 мин или полиэтиленгликолем (8% ПЭГ 6000, 2% NaCl, 25 mM цитратный буфер, pH 4.0). Осадки суспендировали в 25 mM цитратном буфере, pH 4.0, инкубировали в течение 40 мин для корректирующей полимеризации и осветляли центрифугированием при 12000 g в течение 15 мин. Полученные препараты химерных ВПЧ подвергали иммуоферментному и электронно-микроскопическому анализу.

Электронная микроскопия

Образцы, приготовленные по стандартной методике негативного контрастирования с использованием 1% раствора уранилацетата, просматривали на просвечивающем электронном микроскопе JEM-1011 («JEOL», Япония). Фотографировали при помощи цифровой камеры Gatan Erlangshen ES500W, используя программу Gatan Digital Micrograph. × 250000.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Гибридные вирусные векторы

X-вирус картофеля и вирус мозаики альтернатеры относятся к роду *Potexvirus* (потексвирусы) семейства Flexiviridae. Частицы типового ХВК представляют собой гибкие нитевидные вирионы со спиральной структурой длиной 515 и диаметром 13.5 нм. Около 1300 идентичных субъединиц капсидного белка формируют полярную спираль ХВК с шагом 3.6 нм. Вирусная РНК заключена между витками этой спирали, каждый виток спирали включает 8–9 субъединиц КБ. Частицы имеют полый центральный осевой канал диаметром 3 нм [44, 45]. Систему экспрессии на основе геномов потексвирусов создавали с использованием популярного вектора PVX-201, содержащего полную кДНК-копию генома ХВК UK3, клонированную между 35S промото-ром вируса мозаики цветной капусты (CaMV) и Tnos-терминатором [4]. В качестве донора капсидного белка мы использовали ВМАльт, который серологически близок, но не идентичен вирусу мозаики папайи (ВМП) [46]. Отличие КБ ВМП от КБ типового представителя

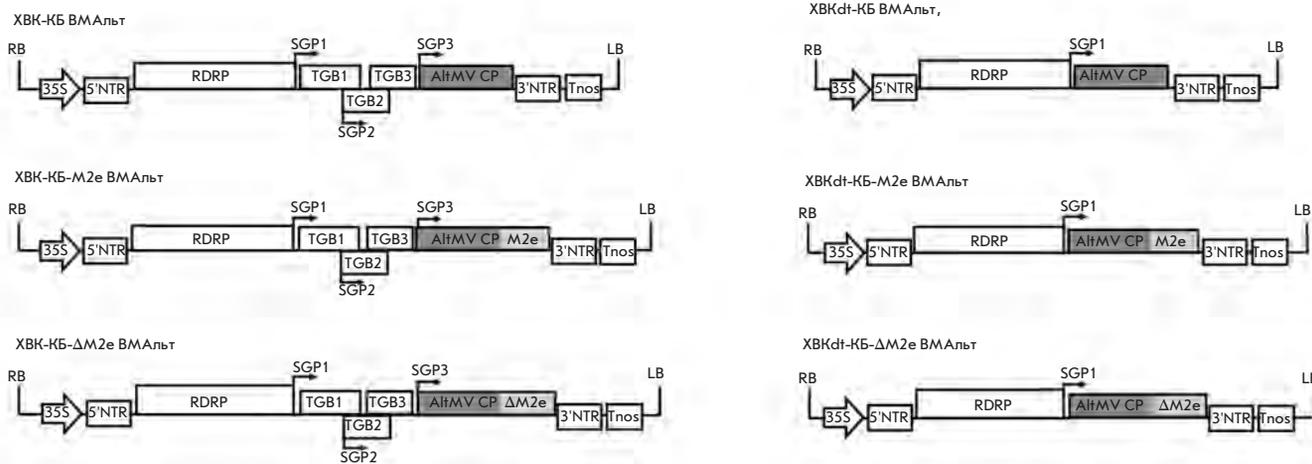


Рис. 1. Схемы гибридных векторов, сконструированных на основе геномов потексвирусов – ХВК и ВМАльт. RDRP (RNA dependent RNA polymerase) – ген вирусной РНК-зависимой-РНК-полимеразы; TGB1, TGB2, TGB3 (triple genes block) – тройной блок генов (25, 12 и 8 кДа); SGP (subgenomic promoter) – промоторы субгеномных РНК, обозначены стрелками; AltMV CP (*Alternanthera mosaic virus capsid protein*) – ген капсидного белка ВМАльт; M2e, N-концевой эктодомен белка М2 вируса гриппа А; ΔМ2е, укороченный вариант М2е; 35S (promoter for the 35S RNA of CaMV) – промотор 35S РНК вируса мозаики цветной капусты; Tnos (terminator of nopaline synthase) – терминатор транскрипции гена нопалинсинтазы; NTR (non-translatable region) – нетранслируемая область; LB (left border) и RB (right border) – левая и правая границы Т-ДНК. Исходный полногеномный вектор ХВК-КБ ВМАльт и укороченный вектор-репликон ХВКdt-КБ ВМАльт содержали фрагменты ДНК, кодирующие полноразмерный нативный КБ ВМАльт. Полногеномные химерные векторы (ХВК-КБ-М2е ВМАльт, ХВК-КБ-ΔМ2е ВМАльт) и химерные векторы-репликоны (ХВКdt-КБ-М2е ВМАльт, ХВКdt-КБ-ΔМ2е ВМАльт) кодировали химерные белки оболочки: КБ-М2е ВМАльт и КБ-ΔМ2е ВМАльт. Перечисленные конструкции клонировали в бинарный вектор для доставки в листья растений методом агробактериальной инъекции.

потексвирусов – ХВК, состоит в его способности образовывать *in vitro* вирусоподобные частицы со спиральным типом симметрии без участия РНК [47]. Данные электронно-микроскопического анализа препаратов КБ ВМАльт свидетельствуют, что капсидный белок ВМАльт также способен образовывать *in vitro* ВПЧ.

На основе геномов ХВК и ВМАльт мы сконструировали два типа гибридных вирусных векторов: ХВК-КБ ВМАльт (полногеномный вариант) и ХВКdt-КБ ВМАльт (репликон-мини-вариант). Геном ХВК-КБ ВМАльт находится под контролем 35S промотора и Tnos-терминатора, содержит 5'- и 3'-нетранслируемые области РНК ХВК, ген РНК-зависимой-РНК-полимеразы ХВК, тройной блок генов транспорта ХВК. Ген КБ ВМАльт экспрессируется под контролем субгеномного промотора КБ ХВК. Геном ХВКdt-КБ ВМАльт также находится под контролем 35S промотора и Tnos-терминатора, содержит 5'- и 3'-нетранслируемые области РНК ХВК, ген РНК-зависимой-РНК-полимеразы ХВК, но в нем отсутствуют гены транспорта, как и в конструкции, описанной в работе [10]. В вирусных векторах ХВКdt-КБ ВМАльт ген капсидного белка ВМАльт находится под контролем субгеномного промотора белка 25 кДа ХВК.

Известно, что для эффективного синтеза целевого белка вирусный вектор должен содержать определенный набор *cis*-действующих элементов в 3'-нетранслируемой области, которые определяют сродство к репликазе, облегчают транскрипцию и трансляцию, обеспечивая максимальный уровень экспрессии чужеродных генов. Так как в гибридных вирусных векторах 3'-концевой ген КБ ХВК заменен геном КБ ВМАльт, при конструировании векторов мы использовали три модельных варианта 3'-НТО: 3'-НТО ХВК (A)₂₄, 3'-НТО ХВК (A)₁₂ и 3'-НТО ХВК р/ср (A)₁₂. 3'-НТО ХВК (A)₁₂ соответствует 3'-концевой области полноразмерной инфекционной кДНК-копии генома ХВК (PVX-201). В 3'-НТО ХВК (A)₂₄ отсутствует последовательность АТАААТ, но поли-(А)-тракт увеличен с 12 до 24 А. 3'-НТО ХВК р/ср (A)₁₂ имеет соответствующий PVX-201 поли-(А)-тракт, но с 5'-конца 3'-НТО увеличена на 60 нуклеотидов за счет прилегающего к НТО 3'-концевого фрагмента гена КБ ХВК.

Таким образом, на первом этапе на основе генома ХВК мы сконструировали два типа гибридных вирусных векторов (рис. 1), ХВК-КБ ВМАльт и мини-вектор-репликон ХВКdt-КБ ВМАльт с тремя

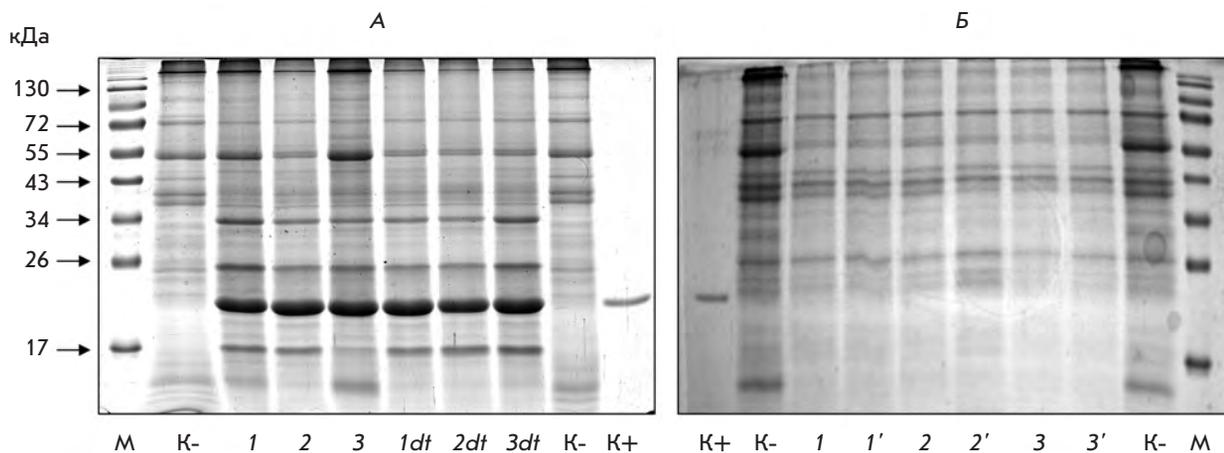


Рис. 2. Накопление капсидного белка ВМАльт в листьях *N. benthamiana* после агроинъекции векторами ХВК-КБ ВМАльт и ХВКdt-КБ ВМАльт с различными 3'-НТО (1 и 1dt, 3'-НТО ХВК (A)₂₄; 2 и 2dt, 3'-НТО ХВК р/ср (A)₁₂; 3 и 3dt, 3'-НТО ХВК (A)₁₂). 12% гель (ДСН-ПААГ), окрашенный Кумасси. На гель нанесены экстракты растворимого белка, соответствующие 2.5 мг растительного материала; К+, КБ ВМАльт – 0.5 мкг; К- – неинкулированный лист (отрицательный контроль); маркеры подвижности белков обозначены М. А – Агроинфицированные листья, 8-й день после агроинъекции; Б – верхние системные листья, 16-й (1, 2, 3) и 20-й (1', 2', 3') дни соответственно после агроинъекции нижних листьев.

вариантами 3'-НТО каждый. Все конструкции клонировали в бинарный вектор pBIN19 для последующего инфицирования растений *N. benthamiana* с помощью агробактерий.

Репликация гибридных вирусных векторов в листьях растений *N. benthamiana*

Эффективность экспрессии гена КБ ВМАльт различными векторами определяли по накоплению капсидного белка в листьях растений *N. benthamiana* на 6–8 день после агроинъекции. Необходимо отметить, что во всех рассмотренных конструкциях репликация гибридного вирусного вектора ХВК-КБ ВМАльт в растениях *N. benthamiana* приводила к накоплению КБ ВМАльт примерно в тех же количествах, как и КБ ХВК при механической инокуляции растений вирусом (более 1 мг на 1 г зеленой массы). ВМАльт обычно накапливается в растениях в более низких концентрациях (около 340 мкг на 1 г зеленой массы).

Мы не обнаружили различий в эффективности продукции КБ при использовании различных вариантов 3'-НТО. Удаление 3'-концевого 60-нуклеотидного фрагмента гена КБ ХВК не снижало уровня КБ ВМАльт, в отличие от данных, приведенных в работе [10]. Можно предположить, что имеющейся гомологии между 3'-концевыми областями генов КБ ХВК и КБ ВМАльт достаточно для эффективной работы полимеразы ХВК. Аналогичные результаты, а именно от-

сутствие преимуществ у какого-либо из вариантов 3'-НТО и сходный уровень накопления рекомбинантного КБ ВМАльт, получены и при репликации вирусных векторов ХВКdt-КБ ВМАльт (рис. 2А). В дальнейшем мы использовали векторные конструкции только с одним вариантом 3'-НТО – с 3'-НТО ХВК (A)₁₂ (рис. 1).

По накоплению рекомбинантного капсидного белка ВМАльт в листьях растений *N. benthamiana* на 6–8 день после агроинокуляции в присутствии гена-супрессора умолкания генов (гена белка р19 вируса кустистой карликовости томатов) мини-векторы ХВКdt-КБ ВМАльт не превосходили векторы ХВК-КБ ВМАльт (рис. 2А).

Известно, что функция межклеточного и системного транспорта ХВК в растениях контролируется четырьмя генами, включая тройной блок генов (ТГВ) и КБ [4]. В «системных», не агроинфицированных листьях растений *N. benthamiana*, агроинокулированных гибридными вирусными векторами ХВК-КБ ВМАльт на 16–20 день мы не обнаружили рекомбинантного КБ ВМАльт (рис. 2Б). Таким образом, замена гена КБ ХВК в рекомбинантных гибридных вирусных векторах на ген КБ ВМАльт приводит к нарушению системного транспорта гибридного вируса.

Электронно-микроскопический анализ экстрактов листьев растений *N. benthamiana*, агроинокулированных гибридными вирусными векторами ХВК-КБ ВМАльт и ХВКdt-КБ ВМАльт, показал, что реком-

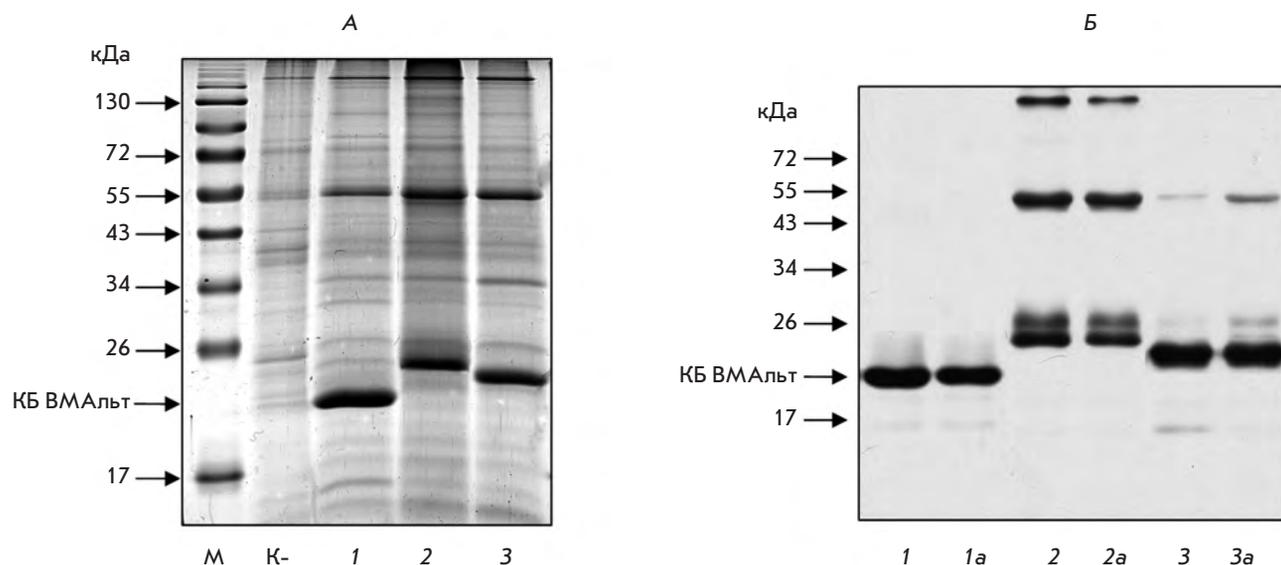


Рис. 3. Накопление КБ ВМАльт и химерных капсидных белков ВМАльт в листьях *N. benthamiana* на шестой день после агроинъекции векторами ХВК-КБ ВМАльт (1) и ХВКΔt-КБ ВМАльт (1a), ХВК-КБ-М2е ВМАльт (2) и ХВКΔt-КБ-М2е ВМАльт (2a), ХВК-КБ-ΔМ2е ВМАльт (3) и ХВКΔt-КБ-ΔМ2е ВМАльт (3a); А – 12% гель (ДСН-ПААГ), окрашенный Кумасси. На гель нанесены экстракты растворимого белка, соответствующие 1.5 мг растительного материала; К- – отрицательный контроль; Б – Вестерн-блот-анализ экстрактов растворимых белков из листьев, агроинкулированных вирусными векторами, с использованием мышиных поликлональных антител к КБ ВМАльт. Маркеры подвижности белков – М. Стрелкой отмечено положение КБ ВМАльт.

бинантный капсидный белок ВМАльт способен формировать протяженные вирусоподобные частицы (см. далее), которые можно использовать в качестве платформы для презентации чужеродных эпитопов. Спектр УФ-поглощения в диапазоне 225–339 нм препарата ВПЧ КБ ВМАльт, выделенного из растительного экстракта, свидетельствует об отсутствии в нем РНК (данные не приведены).

Необходимо отметить, что ВПЧ со спиральным типом симметрии при использовании в качестве платформы для презентации эпитопов патогена имеют некоторое преимущество перед ВПЧ с икосаэдрическим типом симметрии: большее число субъединиц в ВПЧ и соответственно возможность презентации химерными КБ в ВПЧ значительно большего числа эпитопов патогена.

Конструирование гибридных вирусных векторов, экспрессирующих химерные капсидные белки ВМАльт

В качестве модельного чужеродного пептида при создании химерного КБ ВМАльт мы использовали N-концевой домен белка М2 (М2е) вируса гриппа А и его укороченный вариант (ΔМ2е), ответственные за индукцию протективного иммунного ответа [48]. Матриксный (М2) белок вируса гриппа А считается

перспективным кандидатом для создания противовирусной вакцины, так как аминокислотная последовательность эктодомена этого белка (М2е) высококонсервативна и практически не изменилась с момента первого выделения в 1933 г. вируса гриппа А человека [49]. На основании компьютерного анализа 55 изолятов вируса гриппа А человека предложена консенсусная синтетическая аминокислотная последовательность эктодомена белка М2 [50].

Так как конформационная структура КБ ВМАльт в настоящее время не известна, поиск оптимального сайта инсерции, который, с одной стороны, обеспечивает презентацию гетерологичного эпитопа на поверхности капсидного белка, а с другой, минимально влияет на конформацию КБ и не препятствует формированию полимерных структур, проводили с использованием пакета программ DNASTar. В результате выбрали С-концевую локализацию М2е-эпитопа и ΔМ2е-варианта в составе химерного КБ ВМАльт. Нуклеотидная последовательность М2е-эпитопа и ΔМ2е-варианта была сконструирована на основе соответствующей консенсусной аминокислотной последовательности N-концевого домена белка М2 вируса гриппа А с использованием синонимических кодонов, наиболее часто встречающихся в геноме ХВК и капсидного белка ВМАльт.

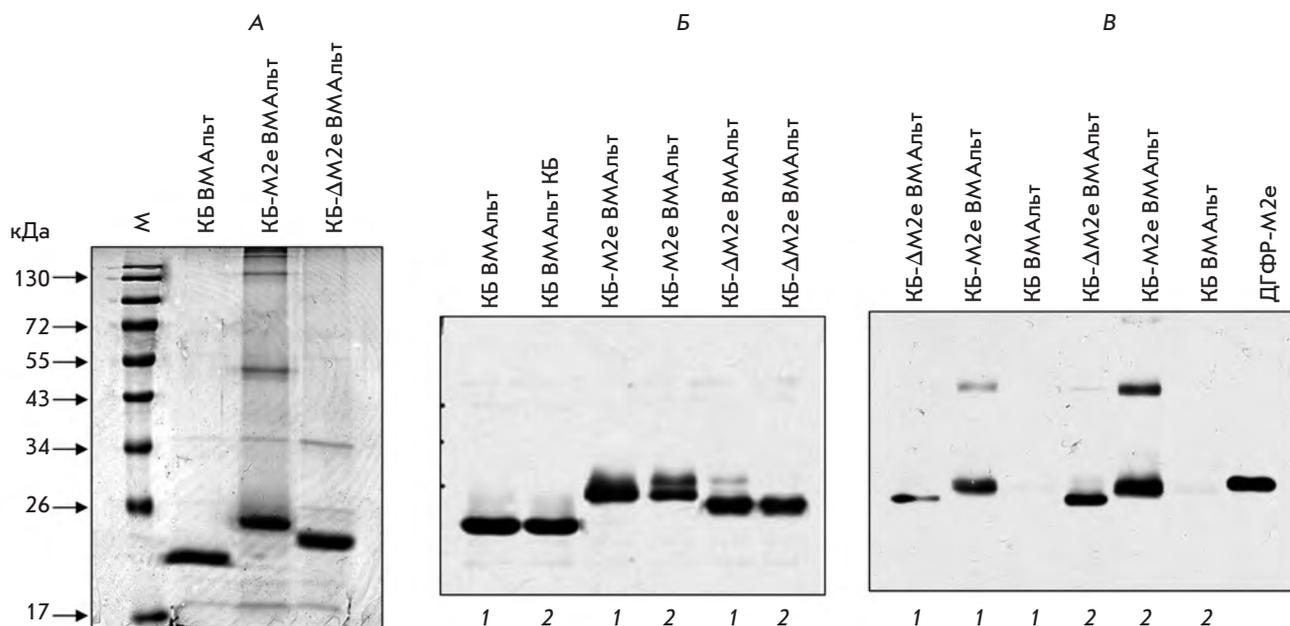


Рис. 4. Анализ препаратов ВПЧ, образованных КБ ВМАльт и химерным капсидным белком ВМАльт с эпитопами белка М2 вируса гриппа А. Препараты ВПЧ выделены из растительного экстракта листьев растений *N. benthamiana* преципитацией полиэтиленгликолем (1) или дифференциальным центрифугированием (2). А – Электрофоретический анализ препаратов ВПЧ, выделенных дифференциальным центрифугированием. 12% гель (ДСН-ПААГ), окрашенный Кумасси. Б – Вестерн-блот-анализ препаратов ВПЧ с использованием поликлональных антител к КБ ВМАльт. В – Вестерн-блот-анализ препаратов ВПЧ с использованием поликлональных антител к М2е-эпитопу. ДГФР-М2е – рекомбинантный белок (ген дигидрофолатредуктазы слит с нуклеотидной последовательностью М2е-эпитопа), который использовали в качестве иммуногена для получения антител к М2е-эпитопу вируса гриппа А; положительный контроль на М2е-эпитоп.

Методом ПЦР получены гены химерных КБ ВМАльт, кодирующие полноразмерный эктодомен белка М2 (23 аминокислотных остатка, М2е-эпитоп), SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD, и укороченный вариант, ΔМ2е (8 аминокислотных остатков, EVETPIRN), слитые с С-концом КБ (КБ-М2е ВМАльт и КБ-ΔМ2е ВМАльт). При помощи клонирования в гибридных вирусных векторах ХВК-КБ ВМАльт и ХВКdt-КБ ВМАльт последовательности вирусного капсидного белка заменяли последовательностями химерных капсидных белков.

Таким образом, на основе генома ХВК нами сконструированы четыре гибридных вирусных вектора, содержащие гены химерных капсидных белков ВМАльт (рис. 1): ХВК-КБ-М2е ВМАльт и его мини-вариант ХВКdt-КБ-М2е ВМАльт; ХВК-КБ-ΔМ2е ВМАльт и его мини-вариант ХВКdt-КБ-ΔМ2е ВМАльт. Этими конструкциями трансформировали компетентные клетки агробактерий для инфицирования растений *N. benthamiana*.

Экспрессия химерных капсидных белков ВМАльт в листьях растений *N. benthamiana*

Гибридные вирусные векторы на основе генома ХВК, кодирующие гены химерных капсидных белков ВМАльт (КБ-М2е и КБ-ΔМ2е), агроинъецировали в листья растений *N. benthamiana*. На шестые-восьмые сутки после агроинъекции синтез химерных белков оценивали количественно фракционированием растворимых белков в ПААГ и окраской Кумасси (рис. 3А). Химерные капсидные вирусные белки идентифицировали методом Вестерн-блотинга с поликлональными антителами к КБ ВМАльт или к М2е-эпитопу (рис. 3Б). Как и в случае КБ ВМАльт, мы не обнаружили различий в накоплении химерных капсидных белков при репликации полноразмерного гибридного вирусного вектора или его мини-варианта. Продукция КБ-М2е и КБ-ΔМ2е зависела от индивидуальных особенностей растения, ярусности листа, условий сезонности. Тем не менее, из электрофореграмм, представленных на рис. 3, следует, что уровень накопления химерных капсидных белков ВМАльт (КБ-М2е и КБ-ΔМ2е) в листьях

растений сравним с уровнем рекомбинантного КБ ВМАльт и составляет более 1 мг (в некоторых опытах до 3 мг) на 1 г зеленой массы.

Химерные капсидные белки ВМАльт с М2е-эпитопом и ΔМ2е-вариантом, так же как и исходный капсидный белок ВМАльт, формируют протяженные вирусоподобные частицы при снижении рН до 4.0–4.9 в условиях низкой ионной силы раствора. Препарат химерных ВПЧ можно выделить из растительного экстракта дифференциальным центрифугированием или преципитацией полиэтиленгликолем. На рис. 4 и рис. 5 представлены результаты электрофоретического, иммуноферментного и электронно-микроскопического анализов препаратов химерных ВПЧ. Как следует из приведенных данных, в процессе накопления, полимеризации и выделения эпитопы белка М2 вируса гриппа А не элиминируются, что свидетельствует о стабильности химерного КБ ВМАльт при С-концевой локализации чужеродного эпитопа. Тот факт, что чужеродный эпитоп при С-концевой локализации не препятствует полимеризации химерного КБ ВМАльт, указывает на различия в конформации С-концевых областей КБ ВМАльт и ХВК [51].

ВЫВОДЫ

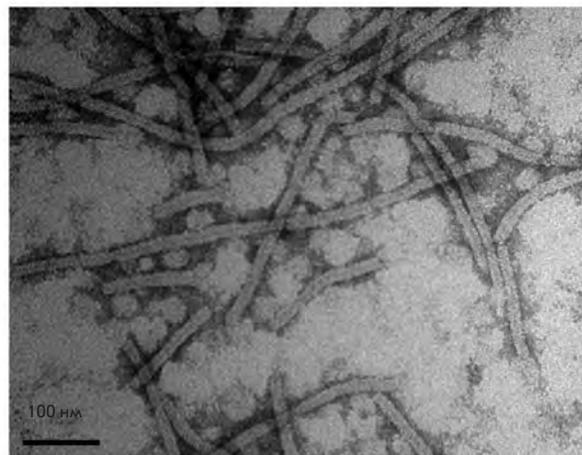
Цель нашей работы состояла в создании системы презентации гетерологичных эпитопов (эпитопов патогена) на поверхности вирусоподобных частиц, образованных капсидным белком фитовируса. На основе генома ХВК и гена КБ ВМАльт сконструированы гибридные вирусные векторы ХВК-КБ ВМАльт и ХВКdt-КБ ВМАльт, обладающие рядом преимуществ по сравнению с исходными вирусами, ХВК и ВМАльт:

1) уровень накопления рекомбинантного капсидного белка ВМАльт при агроинъекции листьев растений *N. benthamiana* гибридными вирусными векторами достигает 1 мг/г растительного материала, что значительно превышает накопление при механической инокуляции природного хозяина;

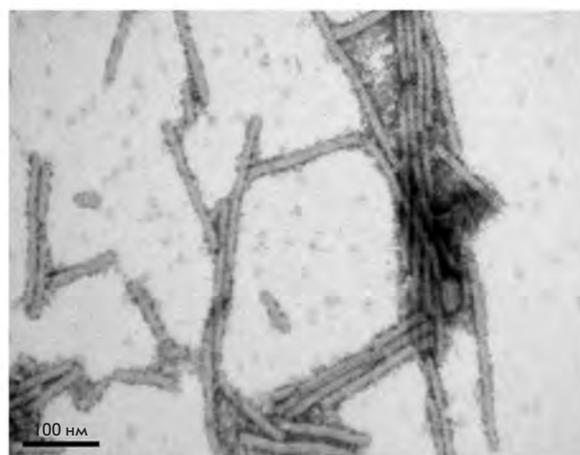
2) замена гена КБ ХВК в гибридных вирусных векторах на ген КБ ВМАльт приводит к подавлению системного транспорта гибридного вируса и нарушению формирования вирусных частиц;

3) способность формировать ВПЧ обеспечивается особенностью капсидного белка ВМАльт, КБ ХВК не обладает способностью образовывать ВПЧ.

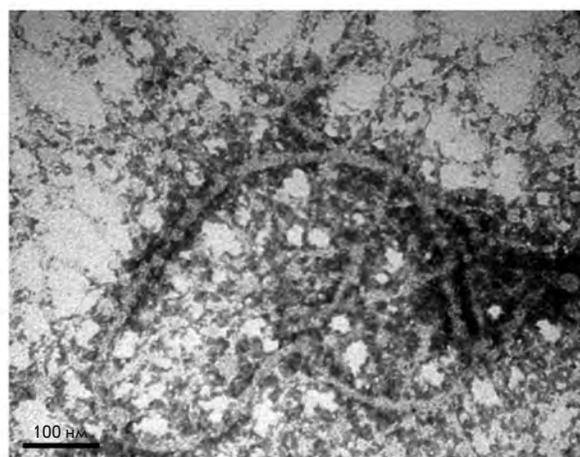
Представленные результаты указывают на возможность применения вирусных векторов ХВК-КБ ВМАльт и ХВКdt-КБ ВМАльт в биотехнологии для продукции вакцинных белков в растениях. Капсидный белок ВМАльт, накапливающийся в высоких концентрациях и формирующий в отсутствие



КБ ВМАльт



КБ-ΔМ2е ВМАльт



КБ-М2е ВМАльт

Рис. 5. Электронно-микроскопический анализ препаратов ВПЧ, выделенных из растительного экстракта листьев растений *N. benthamiana*, образованных КБ ВМАльт, КБ-ΔМ2е ВМАльт и КБ-М2е ВМАльт. Негативное контрастирование 1% раствором уранил-ацетата; × 250000.

геномной РНК вирусоподобные наночастицы, может служить платформой для эффективной презентации на поверхности ВПЧ эпитопов инфекционных агентов человека и животных. Химерные капсидные белки ВМАльт с модельными гетерологичными пептидами, эпитопами белка М2 вируса гриппа А, также способны формировать стабильные ВПЧ. Система экспрессии на основе гибридных вирусных векторов ХВК-КБ ВМАльт и ХВКdt-КБ ВМАльт является генетически безопасной; использование этой векторной системы позволяет избежать самопроизвольного вертикального и горизонтального заражения растений, неконтролируемого распространения генетического материала в окружающей среде. ●

Авторы выражают благодарность П.А. Иванову за предоставление кДНК копии 3'-концевой области геномной РНК ВМАльт, А. Мухамеджановой за препарат мышинных антител к КБ ВМАльт и Т.В. Гасановой за препарат мышинных антител к эпитопу М2е вируса гриппа А.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (государственный контракт 02.527.11.0002) и 7-й рамочной программы Европейского союза (проект PLAPROVA).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Giddings G., Allison G., Brooks D., Carter A. // *Nat. Biotechnol.* 2000. V. 18. № 11. P. 1151–1155.
- Lindbo J.A. // *Biotechnology.* 2007. V. 7. P. 1–11.
- Yusibov V., Rabindran S., Commandeur U., Twyman R.M., Fischer R. // *Drugs.* 2006. V. 7. № 4. P. 203–217.
- Baulcombe D.C., Chapman S., Santa Cruz S. // *Plant J.* 1995. V. 7. № 6. P. 1045–1053.
- Shivprasad Sh., Pogue G.P., Lewandowski D.J., Hidalgo J., Donson J., Grill L.K., Dawson W.O. // *Virology.* 1999. V. 255. № 2. P. 312–323.
- Wagner B., Fuchs H., Adhami F., Ma Y., Scheiner O., Breiteneder H. // *Methods.* 2004. V. 32. № 3. P. 227–234.
- Takamatsu N., Ishikawa M., Meshi T., Okada Y. // *EMBO J.* 1987. V. 6. № 2. P. 307–311.
- Ravin N.V., Kuprianov V.V., Zamchuk L.A., Kochetov A.V., Dorokhov Yu.L., Atabekov J.G., Skryabin K.G. // *Biochemistry (Moscow).* 2008. V. 73. № 10. P. 1108–1113.
- Ravin N.V., Mardanov E.S., Kotyarov R.Y., Novikov V.K., Atabekov J.G., Skryabin K.G. // *Biochemistry (Moscow).* 2008. V. 73. № 1. P. 44–49.
- Komarova T.V., Skulachev M.V., Zvereva A.S., Schwartz A.M., Dorokhov Yu.L., Atabekov J.G. // *Biochemistry (Moscow).* 2006. V. 71. № 8. P. 846–850.
- Natilla A., Hammond R.W., Nemchinov L.G. // *Arch. Virol.* 2006. V. 151. № 7. P. 1373–1386.
- Huang Z., Santi L., LePore K., Kilbourne J., Arntzen Ch.J., Mason H.S. // *Vaccine.* 2006. V. 24. № 14. P. 2506–2513.
- Santi L., Barchelora L., Huang Z., Hjelm B., Kilbourne J., Arntzen Ch.J., Chen Q., Hugh S., Mason H.S. // *Vaccine.* 2008. V. 26. № 15. P. 1826–1824.
- Santa Cruz S., Chapman S., Roberts A.G., Roberts I.M., Prior D.A., Oparka K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. № 13. P. 6286–6290.
- Unde K., Fischer R., Commandeur U. // *Arch. Virol.* 2005. V. 150. № 2. P. 327–340.
- Werner S., Marillonner S., Hause G., Klimyuk V., Gleba Y. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. № 47. P. 17678–17683.
- Zelada A.M., Calamante G., Santangelo M., Bigi F., Verna F., Mentaberry A., Cataldi A. // *Tuberculosis.* 2006. V. 86. № 3–4. P. 263–267.
- Molnar E., Dopfer E.P., Deswal S., Schamel W.W. // *Curr. Pharm. Des.* 2009. V. 15. № 28. P. 3237–3248.
- Lico C., Chen Q., Santi L. // *J. Cell Physiol.* 2008. V. 216. № 2. P. 366–377.
- Noad R., Roy P. // *Trends Microbiol.* 2003. V. 11. № 9. P. 438–444.
- Denis J., Majeau N., Acosta-Ramirez E., Savard Ch., Bedard M.C., Simard S., Lecours K., Bolduc M., Pare Ch., Willems B., et al. // *Virology.* 2007. V. 363. № 1. P. 59–68.
- Denis J., Acosta-Ramirez E., Zhao Y., Hamelin M.-E., Koukavica I., Baz M., Abed Y., Savard Ch., Pare Ch., Macias C.L., et al. // *Vaccine.* 2008. V. 26. № 27–28. P. 3395–3403.
- McCormick A.A., Palmer K.E. // *Expert. Rev. Vaccines.* 2008. V. 7. № 1. P. 33–41.
- Brennan F.R., Jones T.D., Longstaff M., Chapman S., Bellaby T., Smith H., Xu F., Hamilton W.D.O., Flock J.I. // *Vaccine.* 1999. V. 17. № 15–16. P. 1846–1857.
- Porta C., Spall V.E., Loveleand J., Johnson J.E., Barker P.J., Lomonosoff G.P. // *Virology.* 1994. V. 202. № 2. P. 949–955.
- Joelson T., Akerblom I., Oxelfelt P., Strandberg B., Tomenius K., Morris T.J. // *J. Gen. Virol.* 1997. V. 78. № 6. P. 1213–1217.
- Natilla A., Piazzolla G., Nuzzaci M., Saldarelli P., Tortorella C., Antonaci S., Piazzolla P. // *Arch. Virol.* 2004. V. 149. № 1. P. 137–154.
- Мещерякова Ю.А., Эльдаров М.А., Мигунов А.И., Степанова Л.А., Репко И.А., Киселев О.И., Ломоносов Д.П., Скрябин К.Г. // *Молекуляр. биология. (Москва).* 2009. V. 43. № 4. P. 741–750.
- Wu L., Jiang L., Zhou Z., Fan J., Zhang Q., Zhu H., Han Q., Xu Z. // *Vaccine.* 2003. V. 21. № 27–30. P. 4390–4398.
- Jiang L., Li Q., Li M., Zhou Z., Wu L., Fan J., Zhang Q., Zhu H., Xu Z. // *Vaccine.* 2006. V. 24. № 2. P. 109–115.
- Lico Ch., Mancini C., Italiani P., Betti C., Boraschi D., Benvenuto E., Baschieri S. // *Vaccine.* 2009. V. 27. № 31. P. 5069–5076.
- Palmer K.E., Benko A., Doucette S.A., Cameron T.I., Foster T., Hanley K.M., McCormick A.A., McCulloch M., Pogue G.P., Smith M.L., Christensen N.D. // *Vaccine.* 2006. V. 24. № 26. P. 5516–5525.
- Fujiyama K., Sarjung W., Yanagihara I., Nakado J., Misaki R., Honda T., Watanabe Y., Seki T. // *J. Biosci. Bioengin.* 2006. V. 101. № 5. P. 398–402.
- Komarova T.V., Baschieri S., Donini M., Marusic C., Benvenuto E., Dorokhov Yu.L. // *Expert. Rev. Vaccines.* 2010. V. 9. № 8. P. 859–876.
- Nemchinov L.G., Natilla A. // *Protein Expr. Purif.* 2007. V. 56. № 2. P. 153–159.
- Leclerc D., Beauseigle D., Denis J., Morin H., Pare Ch., Lama-

- re A., Lapointe R. // *J. Virol.* 2007. V. 81. № 3. P. 1319–1326.
37. Morin H., Tremblay M.-H., Plante E., Pare Ch., Majeau N., Hogue R., Leclerc D. // *J. Biotechnol.* 2007. V. 128. № 2. P. 423–434.
38. Saunders K., Sainsbury F., Lomonosoff G.P. // *Virology.* 2009. V. 393. № 2. P. 329–327.
39. Kothyarov R.Y., Kuprianov V.V., Migunov A.I., Stepanova L.A., Tsybalova L.M., Kiselev O.L., Ravin N.V., Skryabin K.G. // *Acta Naturae.* 2010. V. 2. № 2(5). P. 71–76.
40. Sambrook J., Russel D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* N.Y.: CSHL Press, 2001.
41. Chen H., Nelson R.S., Sherwood J.L. // *Biotechniques.* 1994. V. 16. № 4. P. 664–668.
42. Laemmli U. // *Nature.* 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
43. Tyulkina L.G., Karger E.M., Sheveleva A.A., Atabekov J.G. // *J. Gen. Virol.* 2010. V. 91. № 6. P. 1621–1628.
44. Tollin P., Wilson H.R. // *The Plant Viruses / Ed. Milne R.C.* N.Y.: Plenum Press, 1988. V. 4. P. 51.
45. Atabekov J.G., Dobrov E.N., Karpova O.V., Rodionova N.P. // *Molec. Plant Pathol.* 2007. V. 8. № 5. P. 667.
46. Geering A.D.W., Thomas J.E. // *Arch. Virol.* 1999. V. 144. № 3. P. 577–592.
47. Erickson J.W., Bancroft J.B. // *Virology.* 1976. V. 72. № 2. P. 514–517.
48. Liu W., Zou P., Chen Y.-H. // *Immunol. Lett.* 2004. V. 93. № 2–3. P. 131–136.
49. Liu W., Zou P., Jian D., Chen Y.-H. // *Microb. Infect.* 2005. V. 7. № 2. P. 171–177.
50. Fiers W., De Filette M., Birkett A., Neiryneck S., Min Jou W. // *Virus Res.* 2004. V. 103. № 1–2. P. 173–176.
51. Lukashina E., Badun G., Fedorova N., Ksenofontov A., Nemykh M., Serebryakova M., Mukhamedzhanova A., Rodionova N., Baratova L., Dobrov E. // *FEBS J.* 2009. V. 276. № 23. P. 7006–7015.

УДК 571.27; 578.224

Активация TLR2-зависимого сигнального пути в клетках WEHI-3В миеломоноцитарного лейкоза мышей приводит к подавлению развития в них апоптоза и к стимуляции прогрессии опухоли в условиях *in vivo*

Д. В. Щебляков*, Д. Ю. Логунов, И. В. Раковская, М. М. Шмаров, Б. С. Народицкий, А. Л. Гинцбург

Федеральное государственное бюджетное учреждение Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи МЗ и СР РФ, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

*E-mail: sdmitryv@yahoo.com

Поступила в редакцию 26.08.2011 г.

РЕФЕРАТ Толл-подобные рецепторы (TLR) являются главными компонентами системы врожденного иммунитета, которые выполняют важные функции в формировании реакций иммунной защиты организма против развивающейся бактериальной или вирусной инфекции. Связывание TLR с собственными лигандами приводит к активации ряда адапторных белков и протеинкиназ, которые участвуют в индукции ключевых провоспалительных факторов. В итоге такой индукции развивается как врожденный иммунный ответ, обусловленный усилением экспрессии ряда провоспалительных цитокинов, антибактериальных белков, так и приобретенный иммунный ответ через созревание дендритных клеток, презентации антигенов и т.д. Благодаря своей способности усиливать специфические и неспецифические иммунные реакции агонисты Толл-подобных рецепторов нашли применение не только в терапии инфекционных заболеваний, но и в химиотерапии различных злокачественных новообразований. Однако различные агонисты TLR могут обладать как противоопухолевым действием (липополисахарид, имиквимод, CpG), так и, напротив, в определенных условиях повышать устойчивость опухолевых клеток к апоптозу и стимулировать их пролиферацию (липополисахарид, липопептид). Нами показано, что активация TLR2-зависимого сигнального пути в клетках миеломоноцитарного лейкоза мышей WEHI-3В при добавлении агониста TLR2 – синтетического липопептида Pam2CSK4, или инфицировании опухолевых клеток *Mycoplasma arginini* приводит к конститутивной активации в них фактора транскрипции NF-κB, подавлению развития апоптоза, а также к усилению прогрессии миеломоноцитарного лейкоза в условиях *in vivo*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА Толл-подобный рецептор 2, синтетический диациллипептид Pam2CSK4, миеломоноцитарный лейкоз мыши WEHI-3В, фактор транскрипции NF-κB, апоптоз, прогрессия опухолей.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ TLR2 – Толл-подобный рецептор типа 2; NF-κB – ядерный фактор транскрипции κB; PAMP – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны; DAMP – молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением; оцРНК – одноцепочечная рибонуклеиновая кислота; ОТ-ПЦР – обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией; TNFα – фактор некроза опухолей α; IL – интерлейкин; MCP1 – фактор хемотаксиса моноцитов 1.

ВВЕДЕНИЕ

Как известно, Толл-подобные рецепторы (TLR) – это основные компоненты системы врожденного иммунитета, участвующие в распознавании консервативных молекулярных структур различных патогенов (PAMP), а также молекул, ассоциированных с по-

вреждением (DAMP) [1, 2]. При этом взаимодействие бактериальных структур или DAMP со специфическими Толл-подобными рецепторами инициирует развитие реакций как врожденного, так и приобретенного иммунного ответа, приводя в конечном итоге к элиминации возбудителя из организма [3, 4].

В настоящее время известно 13 Толл-подобных рецепторов человека (TLR1–13), большинство из которых представлены на поверхности различных клеток иммунной системы (макрофаги, дендритные и тучные клетки, нейтрофилы, В- и Т-клетки, натуральные киллеры), а также на таких неиммунных клетках, как фибробласты, эпителиальные клетки, кератиноциты и т.д. [5–7]. Взаимодействие Толл-подобных рецепторов со специфическими лигандами инициирует каскад сигналов, берущих начало от цитоплазматических TIR-доменов TLR [8]. Сигнал от TIR-домена через адапторные молекулы MyD88 (myeloid differentiation factor 88), TIRAP (TIR-доменсодержащие адапторы), TICAM1 (TRIF), TICAM2 (TIR-containing adapter molecule) передается на соответствующие киназы (ТАК, IKK, ТВК, MAPK, JNKs, p38, ER K, Akt и др.), которые дифференциально активируют факторы транскрипции (NF- κ B, AP-1 и IRF), ответственные за экспрессию различных провоспалительных и антимикробных факторов (IL-6, IL-8, TNF, IL-1 β) и активацию антигенпредставляющих клеток [7, 9].

Показано, что Толл-подобные рецепторы играют центральную роль в регуляции адаптивного иммунного ответа. Так, TLR-зависимая активация антигенпредставляющих дендритных клеток является определяющим моментом в нескольких принципиальных для развития адаптивного иммунитета процессах: активации зрелых Т-клеток; процессинга и презентации микробных антигенов; повышении экспрессии костимуляторных молекул (CD80, CD86), необходимых для активации наивных CD4⁺-Т-клеток; подавлении регуляторных Т-клеток посредством продукции IL-6 [8, 10]. Известно также, что TLR-зависимая активация важна для созревания В-клеток во время инфекции [11]. Таким образом, TLR выполняют в организме важную роль, которая заключается в развитии воспалительных реакций (активации врожденного иммунитета) в ответ на попадание в организм самых разных патогенов (простейших, грибов, бактерий, вирусов) [12].

В настоящее время широко обсуждается влияние экспрессии и активации Толл-подобных рецепторов на прогрессию опухолей. Показано, что в зависимости от различных факторов (типа TLR и лиганда, типа опухоли, способа введения, концентрации лигандов) Толл-подобные рецепторы могут оказывать на опухолевые клетки двойственный эффект [13]. Показано, что TLR способны активировать противоопухолевый иммунитет [14, 15]. Сейчас проводятся клинические испытания многих агонистов TLR в качестве противоопухолевых средств. Так, природные (оцРНК) и синтетические (имиквимод) агонисты TLR7 и -8 показали высокую активность в отношении хронического лимфоцитарного лейкоза и опухолей кожи

[16]. Лиганд TLR9 – CpG, способен подавлять рост лимфом, опухолей головного мозга, почек, кожи [14]. А лиганд TLR3 – poly(IC), обладает проапоптотическим действием не только в отношении опухолевых клеток, но и клеток, окружающих опухоль (например, эндотелиальных).

Однако, несмотря на данные о противоопухолевой активности агонистов TLR, в последнее время появляется большое число публикаций, показывающих, что лиганды TLR способны стимулировать прогрессию опухолей различного типа [15–17]. Известно, что уровень TLR повышен в клетках различных опухолей, а у мышей с нокаутом генов *TLR* снижена частота образования индуцируемых опухолей [18]. Более того, повышение экспрессии TLR на поверхности клеток опухолей предстательной железы или опухолей головы и шеи может стимулировать пролиферацию этих клеток [19, 20]. Huang и соавт. [20] показали, что *Listeria monocytogenes* обладает прямым опухолестимулирующим действием, связанным со способностью активировать TLR2-зависимые сигнальные пути в клетках рака яичника. Более того, TLR2-зависимая активация NF- κ B, вызванная *L. monocytogenes*, повышала устойчивость опухолевых клеток к действию химиотерапевтических средств [16]. Взаимосвязь TLR2 с прогрессией опухолей подтверждена в работе Karin и соавт. [21], в которой доказана ключевая роль этого рецептора в метастазировании рака легкого.

Таким образом, двойственный эффект TLR говорит о его более сложной функциональной роли в биологии опухоли и требует системного изучения на различных моделях.

В нашей работе проведен анализ экспрессии TLR2 в различных опухолевых линиях. На модели миеломоноцитарного лейкоза мышшей (WENI-3B) показано, что активация TLR2-зависимого сигнального пути в результате добавления синтетического диациллипептида Pam2CSK4 приводит к подавлению апоптоза, а также к усилению опухолевого роста в условиях *in vivo*. При этом подобный эффект наблюдался и при заражении клеток WENI-3B *Mycoplasma arginini*. Нами установлено, что микоплазменная инфекция или добавление к клеткам WENI-3B агониста TLR2 – диациллипептида Pam2CSK4, приводит к TLR2-зависимой активации фактора транскрипции NF- κ B в опухолевых клетках и к подавлению развития апоптоза, вызванного действием различных противоопухолевых средств. Более того, на модели миеломоноцитарного лейкоза мышшей *in vivo* нами показано, что внутримышечное введение Pam2CSK4 приводило к повышению устойчивости опухоли к действию 5-фторурацила, усилению опухолевого

роста и к сокращению продолжительности жизни мышей. Анализ механизма описанного эффекта агониста TLR2 на клетки WENI-3B показал, что ключевую роль в стимуляции прогрессии опухоли играет активация фактора NF- κ B, а также стимуляция секреции ряда провоспалительных цитокинов, являющихся факторами роста и прогрессии опухолей миеломоноцитарного происхождения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клеточные линии

Экспрессию TLR2 анализировали в клетках миеломоноцитарного лейкоза мышей WENI-3B, в трансформированных макрофагах мышши B10M, фибробластах мышши L929, в клетках моноцитарной лимфомы человека U937, в клетках рака легкого человека линий A549 и H460, клетках H1299 немелкоклеточного рака легкого человека, HCT116 рака толстой кишки человека и MCF-7 – рака молочной железы человека. Активность NF- κ B, каспаз-3/7, жизнеспособность, уровень трансмембранного митохондриального потенциала, скорость пролиферации анализировали в клетках WENI-3B.

Клетки WENI-3B культивировали в среде RPMI с добавлением 10 об.% фетальной бычьей сыворотки (кат. номер SV30160.03, «HyClone», США), 1 мг/мл глутамин (кат. номер Ф032, «ПанЭко», Россия), 50 Ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (кат. номер А065, «ПанЭко», Россия) при 37°C, в атмосфере 5% CO₂. Клетки рассеивали в отношении 1 : 6 на вторые сутки.

Бактериальные штаммы

В работе использовали штамм микоплазмы *Mycoplasma arginini*, любезно предоставленный И.В. Раковской (лаборатория микоплазм и Л-форм бактерий ГУНИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН).

Реактивы

В работе использовали синтетический диациллипептид Pam2CSK4 («Invivogen», США). Концентрацию хемокинов и цитокинов определяли с использованием набора для проточной цитофлуориметрии FlowCytomix BenderMedsystems (Австрия).

Реакция обратной транскрипции

Экспрессию генов *TLR2* в различных линиях клеток человека/мышши определяли методом ОТ-ПЦР. Суммарную РНК выделяли с помощью реагента TRIZOL («Invitrogen»). Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием набора реагентов RT System («Promega»). кДНК генов *TLR2* и *GAPDH* человека/мышши амплифицировали методом ПЦР

с использованием следующих праймеров: ген *TLR2* мышши – прямой праймер 5'-gtttctctctgaccaggatc-3', обратный праймер 5'-gaataaaaggcgtctcctc-3'; ген *TLR2* человека – прямой праймер 5'-acctgtgtgactctccatcc-3', обратный праймер 5'-gcagcatcattgtctcttc-3'; ген *GAPDH* человека – прямой праймер 5'-tctagacggcaggcaggccacc-3', обратный праймер 5'-ccaccatggcaaatccatggca-3'; ген *GAPDH* мышши – прямой праймер 5'-gcattctctgtgcagtgc-3', обратный праймер 5'-tcacaccatcacaacaacatg-3'.

Измерение активности β -галактозидазы

Через 24 ч после добавления исследуемых препаратов к клеткам культуральную среду удаляли и добавляли лизирующий буфер с субстратом для β -галактозидазы (1 мМ MgCl₂; 0.25 М Трис-НСl рН 7.4; 0.02% NP40; 2 г/л о-нитрофенил- β -D-галактопиранозид (кат. номер 102473, «MP Biomedicals», США)). Активность β -галактозидазы определяли спектрофотометрически (414 нм) по превращению субстрата – о-нитрофенил- β -D-галактопиранозид, в окрашенный продукт о-нитрофенол.

Анализ жизнеспособности клеток

Выживаемость клеток оценивали по соотношению (%) интенсивности окраски метиленовым синим клеток, обработанных цисплатином, таксоллом, фторурацилом в различных концентрациях, и контрольных необработанных клеток (метиленовый синий экстрагировали 0.1% SDS, его количество определяли спектрофотометрически).

Измерение активности каспаз-3/7

Уровень каспаз-3/7 измеряли, используя специфичный для каспазы-7 флуорогенный субстрат Ac-DEVD-AMC (30 мкМ в лизирующем буфере рН 7.0, содержащем 10 мМ HEPES, 0.4 мМ EDTA, 0.1% CHAPS, 2% глицерин, 2 мМ DTT). После 16 ч инкубации клеток с препаратами, индуцирующими апоптоз, измеряли флуоресценцию в точке 0 и спустя 6 ч после добавления субстрата, используя мультиспектрофотометр Wallac 1420 plate reader («Perkin Elmer»).

Измерение уровня митохондриального трансмембранного потенциала ($\Delta\psi_m$)

Уровень трансмембранного митохондриального потенциала ($\Delta\psi_m$) оценивали по связыванию флуорогенного красителя DioC6 («Sigma», США), степень специфического связывания которого с мембранами митохондрий зависит от величины $\Delta\psi_m$. Клетки, инфицированные *M. arginini*, вносили в 24-луночный планшет (10⁵ клеток/луночка). После индукции

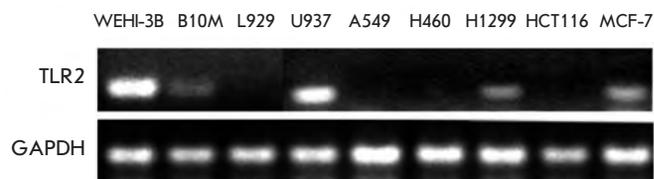


Рис. 1. Анализ экспрессии Толл-подобного рецептора 2 в различных опухолевых клеточных линиях.

апоптоза к клеткам добавляли DioC6 в концентрации 40 нМ. Клетки инкубировали в течение 30 мин при +37°C, после чего дважды промывали фосфатным буфером. Затем измеряли флуоресценцию при помощи мультиволнового спектрофотометра Wallac 1420 plate reader.

Измерение концентрации цитокинов

Мышам линии BALB/c внутримышечно вводили по 5 мкг Pam2CSK4. У мышей отбирали кровь и в полученной сыворотке методом проточной цитофлуориметрии с использованием набора FlowCytomix BenderMedSystems (Австрия) определяли концентрации 14 хемокинов и цитокинов (IL-1, -2, -4, -5, -6, -10 и -12, TNF α , MCP-1 и -3, MIP-1a, -1b, RANTES, интерферона- γ).

Лабораторные животные

В работе использовали 6-недельных (к началу экспериментов) самок мышей линии BALB/c, а также бестимусных мышей линии D2&I.

Анализ выживаемости мышей линии BALB/c

Для оценки влияния диацилллипопептида Pam2CSK4 на скорость прогрессии опухолевого роста мышам линии BALB/c, разделенным на различные группы, вводили внутрибрюшинно клетки WENI-3B по 2×10^6 клеток/мышь. Через 1, 3, 5 сут после перевивания опухоли мышам вводили по 5 мкг Pam2CSK4. Через 20 сут мышей безболезненно умерщвляли с помощью диэтилового эфира и извлекали печень и селезенку, которые использовали для макроскопического и гистологического исследования. Дополнительно в каждой экспериментальной группе определяли средний вес селезенки.

Влияние совместного введения Pam2CSK4 и клеток опухоли на выживаемость животных изучали на мышах линии BALB/c, которым внутрибрюшинно прививали клетки WENI-3B (2×10^6 клеток/мышь), а через 24 ч системно вводили синтетический диацилллипопептид (Pam2CSK4) в дозе 5 мкг/мышь. Спустя 2 сут мышам в течение 3 дней также вводили Pam2CSK4, а мыши из групп, подвергнутых химио-

терапии, получали еще и по 0.6 мг 5-фторурацила. В контрольные группы вошли животные, которым отдельно вводили Pam2CSK4 и 5-фторурацил. Каждая группа состояла из 10 мышей. Животных наблюдали до момента гибели последней мыши (32 дня), регистрируя их общее состояние.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ экспрессии Толл-подобных рецепторов 2 и 6 в различных опухолевых линиях клеток

Модель для изучения влияния TLR2 на пролиферацию опухолевых клеток, а также на прогрессию опухоли в условиях *in vivo* мы выбирали, анализируя экспрессию Толл-подобного рецептора 2 в различных линиях опухолевых клеток (WENI-3B, B10M, L929, U937, A549, H460, H1299, HCT116, MCF-7) методом обратной транскрипции с последующей ПЦР на ген *TLR2* (рис. 1).

Показано, что в пяти из девяти проанализированных клеточных линий (WENI-3B, B10M, U937, H1299 и MCF-7) экспрессируется Толл-подобный рецептор 2. При этом наибольшая экспрессия этого рецептора наблюдалась в клетках миеломоноцитарного лейкоза мыши (WENI-3B), которые и были выбраны в качестве модели для использования в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Агонист TLR2 активировал NF-kB и подавляет развитие апоптоза в опухолевых клетках WENI-3B, экспрессирующих Толл-подобный рецептор 2

На следующем этапе работы для оценки влияния агонистов TLR2 на апоптоз, вызванный действием химиотерапевтических препаратов, в клетках WENI-3B, экспрессирующих Толл-подобный рецептор 2, измеряли следующие параметры: определяли активность фактора NF-kB (рис. 2), выживаемость клеток, уровень каспаз-3/7 (рис. 3), а также величину трансмембранного митохондриального потенциала ($\Delta\psi_m$) (рис. 4). Клетки WENI-3B инфицировали *M. arginini* или добавляли агонист TLR2 – синтетический диацилллипопептид (Pam2CSK4), после чего обрабатывали цисплатином, таксолом или фторурацилом. После инкубации в течение 16–18 ч измеряли указанные параметры.

Нами показано, что микоплазменная инфекция опухолевых клеток WENI-3B, содержащих Толл-подобный рецептор 2, вела к активации в них фактора транскрипции NF-kB (рис. 2). Аналогичные результаты получены при добавлении синтетического диацилллипопептида Pam2CSK4.

На рис. 2А приведены полученные методом проточной цитофлуориметрии с использованием специфических антител к TLR2 данные, подтвержда-

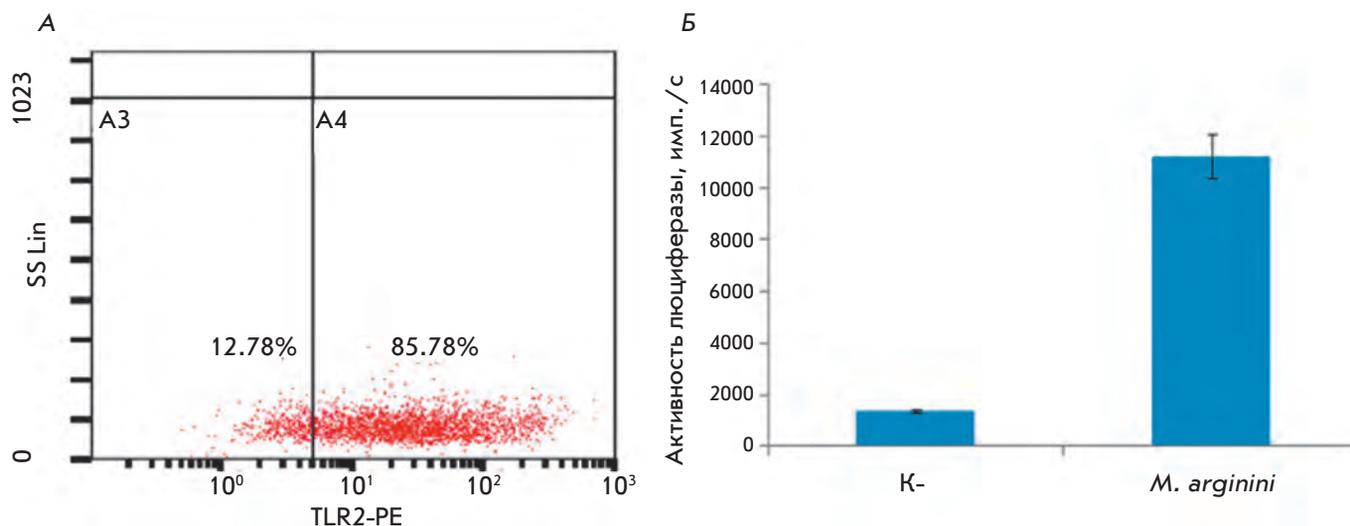


Рис. 2. Активация NF- κ B в клетках WEHI-3B в ответ на микоплазменную инфекцию или добавление диациллипопептида Pam2CSK4. **А** — Экспрессия TLR2 в клетках WEHI-3B. Экспрессия основного рецептора диациллипопептидов микоплазмы подтверждена методом проточной цитофлуориметрии. Клетки WEHI-3B инкубировали с антителами, специфичными к TLR2 («eBioscience», США). Контрольные клетки инкубировали с изотипическим контролем (анти-IgG). Исходя из фоновой флуоресценции отрицательного контроля определен процент TLR2-позитивных клеток (измерение TLR2 проведено в полном соответствии с рекомендациями производителя). **Б** — NF- κ B-зависимая экспрессия гена люциферазы. В клетки WEHI-3B методом лентивирусной трансфекции был введен элемент, реагирующий на NF- κ B, под контролем которого находится ген люциферазы. Клетки инфицировали *M. arginini* или добавляли синтетический диациллипопептид Pam2CSK4, после чего в инфицированных и контрольных (неинфицированных) клетках, используя стандартную методику, определяли уровень NF- κ B-зависимой экспрессии гена люциферазы.

дающие экспрессию TLR2, основного рецептора диациллипопептидов микоплазмы, а также данные по активации NF- κ B TLR2-зависимым способом в клетках WEHI-3B (рис. 2Б).

На рис. 3 показана выживаемость и уровень активности основных эффекторных каспаз-3/7 при индукции апоптоза химиотерапевтическими средствами в клетках WEHI-3B, инфицированных *M. arginini* или при добавлении к ним Pam2CSK4. Уровень каспаз-3/7 измеряли спектрофотометрически, используя специфический флуорогенный субстрат Ac-DEVD-AMC. Как видно из представленных результатов, микоплазменная инфекция или добавление липопептида Pam2CSK4 приводили к статистически значимому ($p < 0.005$) повышению выживаемости клеток WEHI-3B и снижению уровня активации каспаз-3/7 на 25–30% при различных внутриклеточных повреждениях по сравнению с неинфицированными клетками (белые столбцы).

В клетках WEHI-3B измеряли также величину трансмембранного митохондриального потенциала ($\Delta\psi_m$), падение которого в ответ на различные стрессорные воздействия служит основным маркером апоптоза.

С этой целью на инфицированные или обработанные Pam2CSK4 клетки воздействовали цисплатином в различной концентрации и через 16 ч измеряли уровень трансмембранного митохондриального потенциала ($\Delta\psi_m$) (рис. 4).

Уровень $\Delta\psi_m$ оценивали по связыванию флуорогенного красителя DioC6, степень специфического связывания которого с мембранами митохондрий зависит от величины $\Delta\psi_m$.

Как видно из представленных результатов, в обработанных цисплатином инфицированных *M. arginini* клетках WEHI-3B величина трансмембранного митохондриального потенциала была на 25–30% выше, чем в неинфицированных клетках (белые столбцы), что свидетельствует о подавлении апоптоза в инфицированных клетках. Аналогичные результаты получены и при использовании синтетического диациллипопептида Pam2CSK4.

Таким образом, в первой части экспериментов *in vitro* показано, что микоплазменная инфекция или добавление структурных компонентов микоплазмы к клеткам WEHI-3B, экспрессирующим Толл-подобные рецепторы 2 и 6, приводит к активации в них фактора транскрипции NF- κ B и подавлению апоптоза при различных внутриклеточных повреждениях.

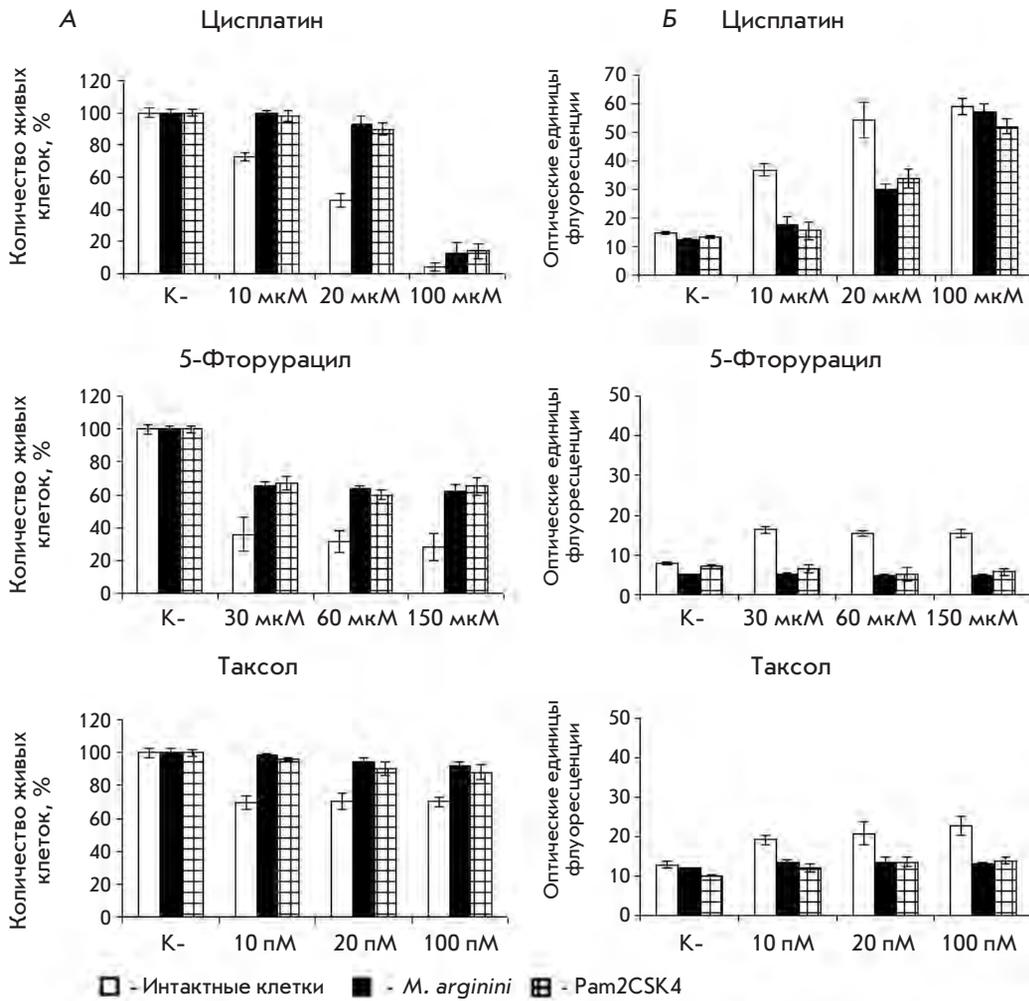


Рис. 3. Выживаемость и активность каспаз-3/7 в клетках WENI-3В миеломоноцитарного лейкоза мышей, подвергнутых воздействию химиотерапевтических средств в различных концентрациях. А – Выживаемость клеток WENI-3В; Б – активность каспазы-3/7. Данные по каждой точке получены в результате трех независимых опытов ($p < 0.005$).

Кинетика роста опухолевых клеток WENI-3В при инфекции *M. arginini* или добавлении диациллипептида Pam2CSK4 в эксперименте *in vitro*

Фактор транскрипции NF-κB участвует в регуляции экспрессии целого ряда белков, среди которых белки, контролируемые клеточную пролиферацию и апоптоз [19].

На следующем этапе работы мы решили посмотреть как микоплазменная инфекция или структурные компоненты микоплазмы наряду с антиапоптотической активностью могут влиять на кинетику и скорость пролиферации опухолевых клеток WENI-3В в норме и/или при индукции в этих клетках апоптоза.

С этой целью к клеткам WENI-3В, выбранной в качестве модели, добавляли *M. arginini* или Pam2CSK4, после чего подтверждали активацию NF-κB в этих клетках. Далее клетки высаживали на 96-луночный планшет (10³ клеток на лунку) и добавляли апоптоз-индуцирующие препараты – цисплатин и таксол. Ки-

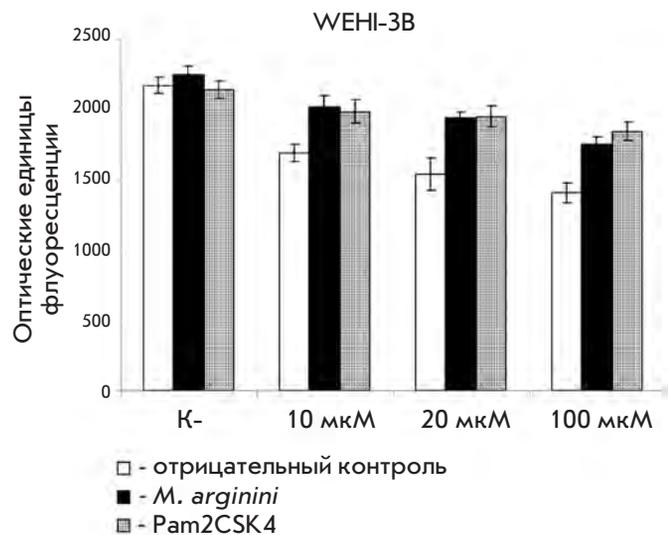


Рис. 4. Уровень трансмембранного митохондриального потенциала ($\Delta\psi_m$) в клетках WENI-3В, обработанных цисплатином в различных концентрациях. Данные по каждой точке получены в результате трех независимых опытов ($p < 0.005$).

нетику роста клеток определяли по накоплению клеточной биомассы (окрашивание метиленовым синим) в течение 72 ч в отсутствие или при наличии стимула апоптоза.

Из рис. 5 видно, что в клетках, инфицированных микоплазмой и/или при добавлении Pam2CSK4, наблюдалось блокирование апоптоза и не наблюдалось повышения скорости пролиферации.

Таким образом, показано, что обусловленное активацией фактора транскрипции NF-κB подавление апоптоза в клетках, инфицированных микоплазмой, не приводило к повышению скорости пролиферации клеток *in vitro*.

Влияние агониста TLR2 – диациллипептида Pam2CSK4 – на пролиферацию и резистентность клеток WEHI-3В к химиотерапевтическим средствам в эксперименте *in vivo*

Нами изучено влияние циркулирующих в организме мышей антигенов – агонистов TLR2, на пролиферацию и устойчивость клеток миеломоноцитарного лейкоза мышей WEHI-3В к химиотерапевтическим средствам *in vivo*.

На первом этапе мы оценили влияние диациллипептида Pam2CSK4 на скорость опухолевой прогрессии. В эксперименте участвовало 40 животных (мыши линии BALB/с, самки) массой 18–20 г. Животных разделили на четыре группы по 10 особей в каждой. Контрольную группу (первую) составили интактные мыши. Во вторую группу вошли мыши, которым трехкратно внутримышечно вводили Pam2CSK4. Третья группа состояла из мышей, которым перевели клетки WEHI-3В (2×10^6 клеток/мышь). Мышам четвертой группы внутрибрюшинно перевели клетки WEHI-3В в той же дозе. Мышам этой группы через 1, 3, 5 сут после перевивания опухоли вводили по 5 мкг Pam2CSK4. Для оценки прогрессии опухоли через 20 сут мышей безболезненно умерщвляли с помощью диэтилового эфира и извлекали печень и селезенку, которые использовали для макроскопического и гистологического исследования. В каждой экспериментальной группе определяли средний вес селезенки (рис. 6А–В). По данным макроскопического исследования у мышей из групп 1 и 2 отсутствовали видимые патологические изменения (рис. 6А), но наблюдалось незначительное увеличение среднего веса селезенки у животных группы 2 (рис. 6Б). Макроскопическое исследование печени и селезенки мышей, которым был перевит миеломоноцитарный лейкоз (группа 3), выявило характерные для лейкоза изменения: увеличение селезенки и некоторое увеличение печени. На поверхности печени и селезенки обнаружены редкие опухолевые образования. При макроскопическом исследовании печени и селезенки мышей, которым

был перевит лейкоз и введен Pam2CSK4 (группа 4), также обнаружены характерные для лейкоза изменения. Селезенка была сильно увеличена. На поверхности селезенки и печени обнаружены рыхлые образования (которые при гистологическом исследовании оказались лейкозными миелоцитарными клетками).

Измерение средней массы селезенки показало значимое увеличение веса этого органа у мышей с лейкозом (группы 3 и 4) по сравнению с мышами контроль-

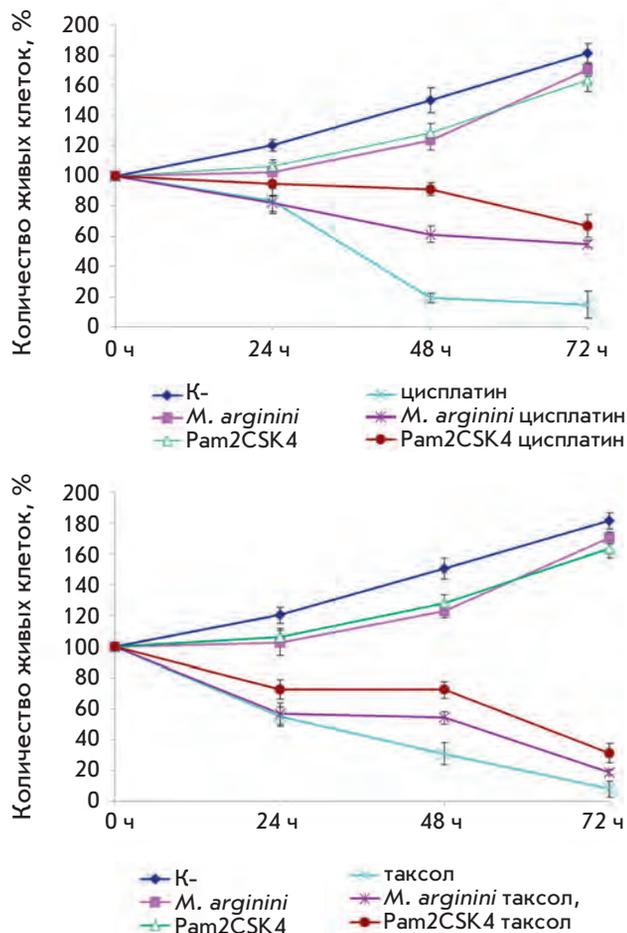


Рис. 5. Кинетика роста клеток WEHI-3В. К – контрольные клетки; *M. arginini* – клетки, инфицированные *M. arginini*; Pam2CSK4 – клетки, обработанные диациллипептидом микоплазмы; цисплатин – контрольные клетки, обработанные цисплатином; *M. arginini* цисплатин – инфицированные *M. arginini* клетки, обработанные цисплатином; Pam2CSK4 цисплатин – последовательно обработанные диациллипептидом микоплазмы и цисплатином клетки; таксол – контрольные клетки, обработанные таксолом; *M. arginini* таксол – инфицированные *M. arginini* клетки, обработанные таксолом; Pam2CSK4 таксол – обработанные диациллипептидом микоплазмы и таксолом клетки ($p < 0.005$).

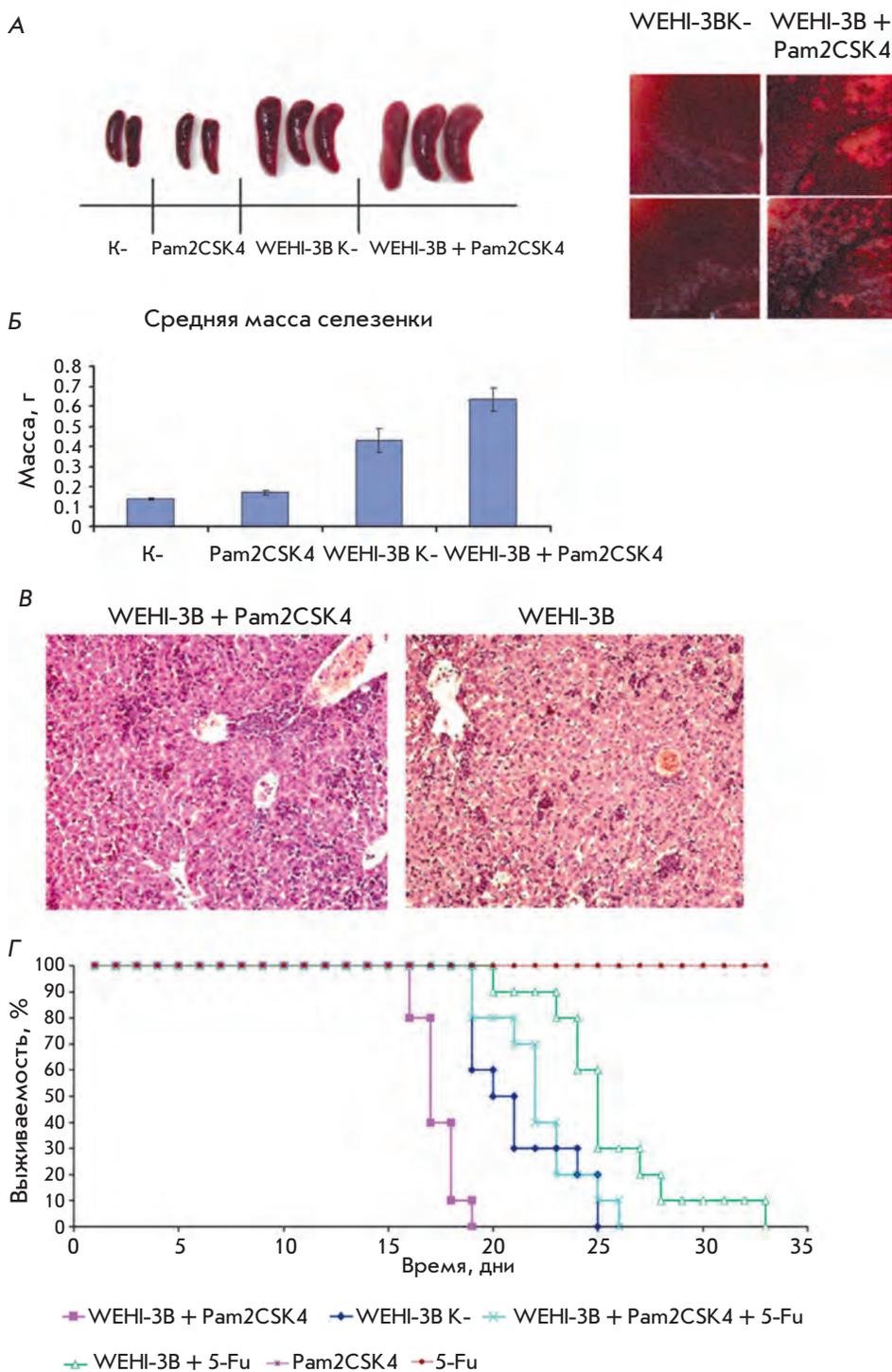


Рис. 6. Влияние диациллипептида Pam2CSK4 на пролиферацию опухолевых клеток WEHI-3B и их резистентность к химиотерапевтическим средствам. **А** – Макрофотографии органов мышей. Слева представлены макрофотографии селезенки, справа – участков печени с инфильтратами. К – группа intactных мышей, инъецированных фосфатно-солевым буфером; Pam2CSK4 – группа мышей, инъецированная диациллипептидом Pam2CSK4; WEHI-3B – группа мышей с перевитыми клетками WEHI-3B; WEHI-3B + Pam2CSK4 – группа мышей с перевитыми клетками WEHI-3B, инъецированная диациллипептидом Pam2CSK4. **Б** – Средняя масса селезенки. Селезенки извлекали из анестезированных мышей. Экспериментальные группы мышей идентичны описанным выше. Для определения средней массы использовали селезенку пяти мышей из каждой группы. **В** – Микрофотографии срезов печени. Извлеченные образцы печени помещали в 10% формалин для фиксации. Далее по стандартной методике образцы заключали в парафин, срезы окрашивали гематоксилин-эозином. **Г** – Диаграмма выживаемости мышей линии BALB/c. WEHI-3B K – группа мышей, которым внутрибрюшинно ввели клетки WEHI-3B; WEHI-3B + Pam2CSK4 – группа мышей, которым внутрибрюшинно ввели клетки WEHI-3B и внутримышечно – Pam2CSK4; WEHI-3B + 5-Fu – группа мышей с внутрибрюшинным введением клеток WEHI-3B, получавших 5-фторурацил; WEHI-3B + Pam2CSK4 + 5-Fu – группа мышей с внутрибрюшинным введением клеток WEHI-3B и внутримышечным введением Pam2CSK4, получавших 5-фторурацил. ($p < 0.001$ по лог-ранговому тесту.)

ных групп 1 и 2. Введение Pam2CSK4 мышам группы 4 еще более увеличивало среднюю массу селезенки ($p < 0.05$) по сравнению с массой у животных группы 3 (рис. 6Б).

Гистологическое исследование селезенки и печени мышей из групп 1 и 2 не выявило патологических изменений. В селезенке мышей из групп 3 и 4 картина была сходной. Наблюдалась диффузная плотная инфильтрация пульпы лейкозными миелоцитарными элементами; лимфатические фолликулы были атрофированы. Наибольшими были отличия между образцами печени мышей из групп 3 и 4. В печени мышей из группы 3 присутствовали многочисленные мелкие лейкозные миелоцитарные инфильтраты, тогда как в группе 4 инфильтраты были значительно крупнее (рис. 6В) Инфильтраты располагались преимущественно по ходу синусоидов. Скопления лейкозных клеток обнаруживались также в отдельных кровеносных сосудах. У мышей группы 4, в отличие от группы 3, наблюдалась выраженная поверхностная инфильтрация печени лейкозными клетками.

Проведенные макро- и микроскопическое исследования образцов селезенки и печени мышей, которым внутрибрюшинно перевивали клетки WEHI-3В, позволили сделать заключение о том, что диациллипептид микоплазмы способствует прогрессии опухолевого заболевания.

На следующей стадии мы оценили влияние диациллипептида Pam2CSK4 на скорость прогрессии опухоли. Одновременно определяли каким образом Pam2CSK4 влияет на резистентность перевиваемых клеток к химиотерапевтическим средствам. Этот опыт проводили по схеме, приведенной в разделе «Экспериментальная часть». На рис. 6Г представлена диаграмма выживаемости мышей, участвующих в эксперименте.

Анализ кривых выживаемости Каплана–Мейера показал, что мыши, получавшие синтетический диациллипептид, хуже отвечали на 5-фторурацил, чем мыши, не получавшие Pam2CSK4. Последняя мышь из группы, получавшей химиотерапию, пала на 33 день, в то время как мыши, одновременно с химиотерапией получавшие Pam2CSK4, пали уже на 26 день.

Выживаемость мышей *in vivo* полностью соответствовала результатам, полученным ранее на культурах клеток. Более того, как видно из диаграммы, все мыши, которым одновременно вводили клетки WEHI-3В и Pam2CSK4, умерли уже на 19 день, в то время как мыши, не получавшие Pam2CSK4, прожили 25 дней. Все это свидетельствует о том, что внутримышечное введение Pam2CSK4 приводило к усилению прогрессии опухоли и сокращению сроков жизни мышей. Примечательно, что результаты

этого эксперимента не согласовывались с данными, полученными на культуре клеток, где добавление Pam2CSK4 в культуральную среду не приводило к повышению скорости пролиферации клеток WEHI-3В.

Влияние диациллипептида Pam2CSK4 на продукцию факторов, стимулирующих пролиферацию клеток WEHI-3В миеломоноцитарного лейкоза мышей *in vivo*

Принимая во внимание основное отличие в скорости роста клеток WEHI-3В *in vitro* и *in vivo* в присутствии Pam2CSK4, мы предположили, что в организме экспериментальных животных после введения диациллипептида может происходить выработка факторов, существенных для пролиферации клеток WEHI-3В, определяя тем самым кинетику их роста *in vivo*.

Для подтверждения выдвинутой гипотезы мы изучили как влияет сыворотка мышей, получавших Pam2CSK4, на скорость пролиферации клеток WEHI-3В. Для этого мышам линии BALB/с внутримышечно вводили по 5 мкг диациллипептида Pam2CSK4. Через 24 ч после инъекции проводили отбор крови мышей для получения сыворотки. В качестве контроля использовали сыворотку мышей, получавших фосфатно-солевой буфер. Сыворотки использовали для приготовления 5% среды культивирования клеток WEHI-3В (RPMI). Среда добавляла к клеткам WEHI-3В, которые высаживали на 96-луночный планшет в концентрации 10^3 клеток/луночку. Кинетику роста клеток определяли по накоплению клеточной биомассы в реакции с субстратом МТТ в течение 72 ч (рис. 7).

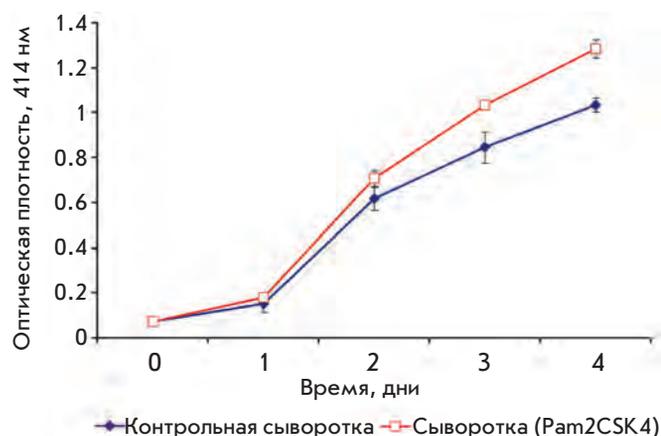


Рис. 7. Кинетика роста клеток WEHI-3В миеломоноцитарного лейкоза мышей, к которым добавили сыворотку мышей, получавших Pam2CSK4 ($p < 0.005$).

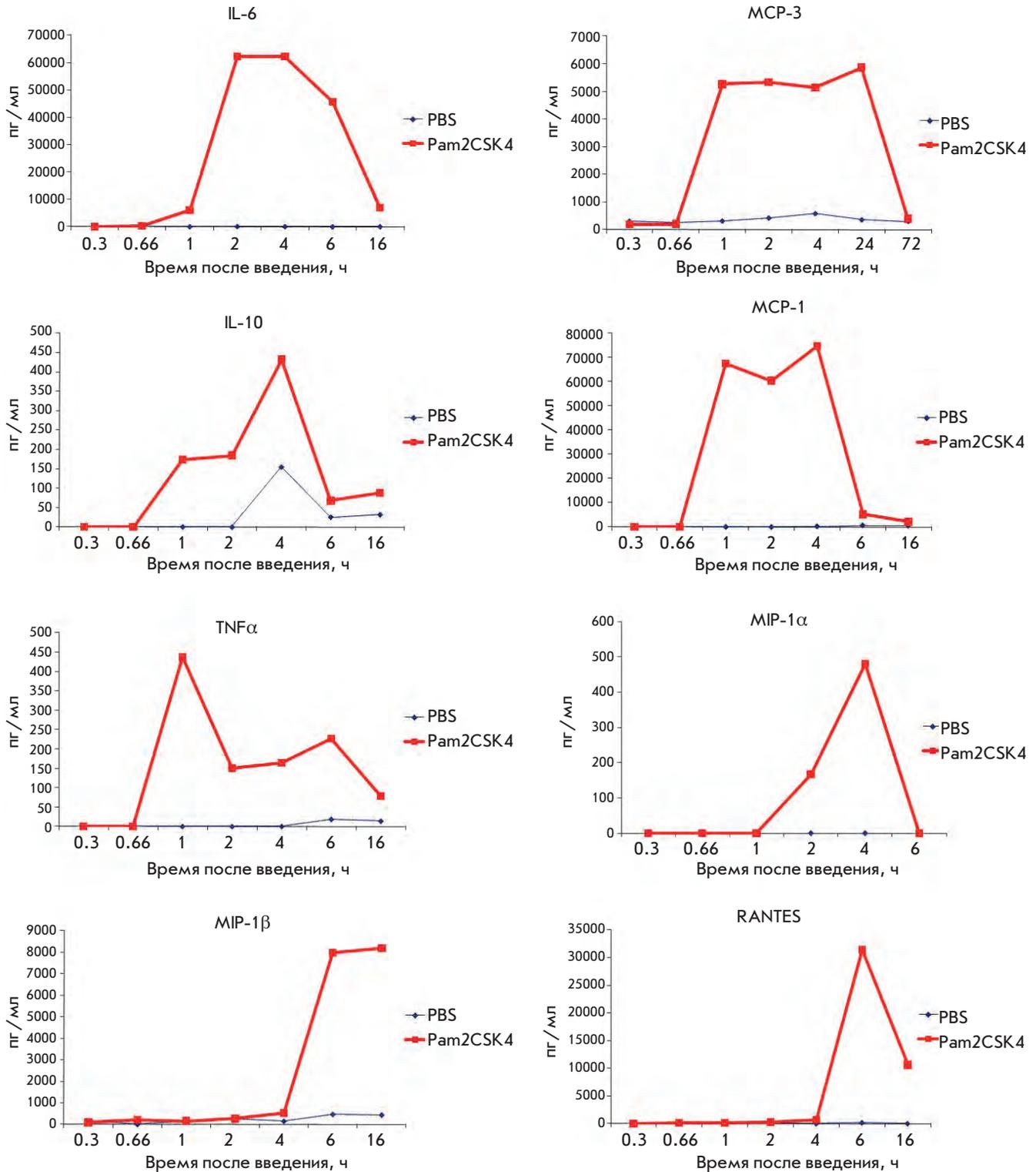


Рис. 8. Определение концентрации цитокинов в сыворотках крови мышей, инъецированных Pam2CSK4. Мышам линии BALB/c вводили диациллипидопептид Pam2CSK4 или фосфатно-солевой буфер (PBS), после чего через указанные интервалы времени отбирали кровь и приготавливали сыворотку. Образцы сыворотки использовали для определения уровня экспрессии цитокинов. Каждая точка представляет собой среднее значение из трех независимых повторов.

Как видно из *рис. 7*, добавление к клеткам WENI-3В сыворотки крови мышей, получавших внутримышечно Pam2CSK4, способствовало увеличению скорости их пролиферации. Результаты этого опыта подтвердили высказанное ранее предположение о возможной выработке фактора, индуцирующего рост клеток миеломоноцитарного лейкоза мышей, в ответ на введение Pam2CSK4.

На следующем этапе была предпринята попытка идентификации факторов, способствующих усилению роста клеток WENI-3В.

С этой целью мы проанализировали синтез хемокинов и цитокинов в организме в ответ на введение диациллипептида (*рис. 8*). Экспрессию цитокинов определяли по методике, описанной в «Экспериментальной части». На *рис. 8* представлены данные для цитокинов, уровень экспрессии которых изменялся в ответ на введение Pam2CSK4. Видно, что в ответ на введение Pam2CSK4 изменялась экспрессия восьми из 14 цитокинов. Анализ опубликованных данных показал, что пять из этих цитокинов способны прямо или опосредованно стимулировать рост опухолей – IL-6, MCP-1, MCP-3, RANTES, TNF α [21].

Таким образом, нами показано, что активация TLR2-зависимого сигнального пути в клетках WENI-3В после добавления диациллипептида Pam2CSK4 или клеток *M. arginini* ведет к конститутивной активации в клетках WENI-3В фактора транскрипции NF-kB. В свою очередь, активация NF-kB приводит к повышению резистентности таких клеток к различным повреждениям, индуцируемым химиотерапевтическими средствами (цисплатином, таксолом, фторурацилом).

В экспериментах *in vitro* было показано, что подавление апоптоза в инфицированных *M. arginini* клетках, обусловленное активацией фактора транскрипции NF-kB, не влияло на скорость пролиферации клеток. Однако другие результаты получены *in vivo*: внутримышечное введение Pam2CSK4 стимулировало рост клеток WENI-3В миеломоноцитарного лейкоза мыши в организме экспериментальных животных. Главным образом этот факт связывается со способностью Pam2CSK4 стимулировать экспрессию факторов (IL-6, MCP-1, MCP-3, RANTES, TNF α), усиливающих рост опухолевых клеток.

Результаты, полученные нами на модели клеток WENI-3В, показывают, что активация Толл-подобного рецептора 2 в опухолевых клетках миеломоноцитарного происхождения, обусловленная микоплазменной инфекцией или прямым действием агониста TLR2 (диациллипептида), стимулирует рост этих клеток. При этом изучение воздействия микоплазмы и ее структурного компонента диациллипептида Pam2CSK4 на течение опухолевого процесса позволяет сделать заключение о том, что микоплазменная инфекция может не только влиять на скорость прогрессии заболевания, но и на эффективность противоопухолевой терапии. Представленное наблюдение может быть верным не только в отношении микоплазм, но и других патогенов, вызывающих различные инфекции у больных со злокачественными новообразованиями. При этом очевидно, что проведение эффективной терапии в случае лейкозов миеломоноцитарного происхождения возможно только при отсутствии стимуляции заболевания факторами патогенных микроорганизмов или их антигенами, циркулирующими в организме. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Medzhitov R. // Nat. Rev. Immunol. 2001. V. 1. P. 135–145.
- Pasare C., Medzhitov R. // Nature. 2005. V. 438. № 7066. P. 364–368.
- Uematsu S., Akira S. // Handb. Exp. Pharmacol. 2008. V. 183. P. 1–20.
- Bianchi M.E. // J. Leukoc. Biol. 2007. V. 81. P. 1–5.
- Diebold S.S. // Handb. Exp. Pharmacol. 2009. V. 188. P. 3–30.
- West A.P., Koblansky A.A., Ghosh S. // Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 2006. V. 22. P. 409–437.
- Тухватулин А.И., Логунов Д.Ю., Щербинин Д.Н., Шмаров М.М., Народицкий Б.С., Гудков А.В., Гинцбург А.Л. // Биохимия. 2010. Т. 75. № 9. С. 1224–1243.
- Aravind L., Dixit V.M., Koonin E.V. // Science. 2001. V. 291. P. 1279–1284.
- Kawai T., Akira S. // Semin. Immunol. 2007. V. 19. P. 24–32.
- Iwasaki A., Medzhitov R. // Nat. Immunol. 2004. V. 5. № 10. P. 987–995.
- Pasare C., Medzhitov R. // Adv. Exp. Med. Biol. 2005. V. 560. P. 11–18.
- Palm N.W., Medzhitov R. // Immunol. Rev. 2009. V. 227. № 1. P. 221–233.
- Щебляков Д.В., Логунов Д.Ю., Тухватулин А.И., Шмаров М.М., Народицкий Б.С., Гинцбург А.Л. // Acta Naturae. 2010. Т. 2. № 3 (6). С. 14–23.
- Krieg A.M. // J. Clin. Invest. 2007. V. 117. P. 1184–1194.
- Chicoine M.R., Zahner M., Won E.K. // Neurosurgery. 2007. V. 60. P. 372–381.
- Stockfleth E., Trefzer U., Garcia-Bartels C. // Br. J. Dermatol. 2003. V. 149 (Suppl. 66). P. 53–56.
- Logunov D., Scheblyakov D., Zubkova O., Shmarov M., Rakovskaya I., Gurova K., Tararova N., Burdelya L., Naroditsky B., Ginzburg A., Gudkov A. // Oncogene. 2008. V. 27. № 33. P. 4521–4531.
- Harmey J.H., Bucana C.D., Lu W. // Int. J. Cancer. 2002. V. 101. P. 415–422.
- Hayden M.S., Ghosh S. // Genes Dev. 2004. V. 18. P. 2195–2224.
- Huang B., Zhao J., Shen S. // Cancer. Res. 2007. V. 67. P. 4346–4352.
- Karin M., Yamamoto Y., Wang Q.M. // Nat. Rev. Drug. 2004. V. 3. P. 17–26.

УДК 577.151.42

Ингибирование ДНК-гиразы левофлоксацином и другими производными фторгетероциклов

В. Л. Туницкая^{1*}, А. Р. Хомутов¹, С. Н. Кочетков¹, С. К. Котовская^{2,3}, В. Н. Чарушин^{2,3}¹Учреждение Российской академии наук Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32²Учреждение Российской академии наук Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, 620041, Екатеринбург, ул. С. Ковалевской/Академическая, 22/20³Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, 620002, Екатеринбург, ул. Мира, 19

*E-mail: ve_fun@mail.ru

Поступила в редакцию 28.09.2011 г.

РЕФЕРАТ Соединения фторхинолонового ряда составляют основу важнейшего класса современных антибактериальных препаратов, обладающих высокой активностью и широким спектром действия. Наиболее перспективным фторхинолоновым препаратом является левофлоксацин – оптически активная форма офлоксацина, антибактериальная активность которого существенно превышает активность других представителей этого семейства. Ранее нами был разработан оригинальный метод получения левофлоксацина, в настоящее время осуществляется выпуск опытных партий препарата. Мишенью действия фторхинолонов является бактериальная ДНК-гираза, и исследование их взаимодействия с последней весьма важно как с теоретической, так и с практической точки зрения. В частности, параметры ингибирования ДНК-гиразы могут служить критерием качества препарата. В статье приводятся результаты исследований взаимодействия ДНК-гиразы с рядом производных фторхинолонов и их аналогов, образцов интермедиатов и полупродуктов синтеза левофлоксацина, а также образцов опытных партий препарата, полученных в ИОС УрО РАН. Выявлена важность двух структурных элементов в молекуле для проявления ингибирующей активности. Полученные данные следует принимать во внимание при дизайне новых лекарственных препаратов на основе фторсодержащих гетероциклов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА фторхинолоны, левофлоксацин, производные, бактериальная ДНК-гираза, ферментативная активность, ингибирование.

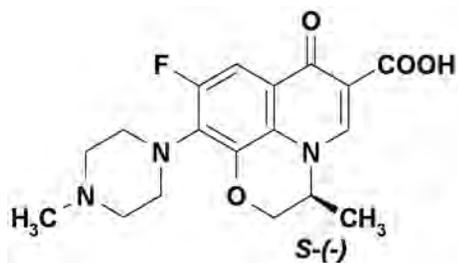
ВВЕДЕНИЕ

Соединения фторхинолонового ряда составляют основу важнейшего класса современных антибактериальных препаратов, обладающих высокой активностью, широким спектром действия. Они представляют основную конкуренцию цефалоспорином и другим антибиотикам, широко используемым в клинической практике при инфекционных заболеваниях [1–11]. Первые представители фторхинолонов (пемфлоксацин, ципрофлоксацин, норфлоксацин, офлоксацин) появились на мировом фармацевтическом рынке в начале 90-х годов прошлого века [1–6]. Сегодня, когда объем продаж ципрофлоксацина достигает 10 млрд долларов США и разработаны новые перспективные препараты этой группы, такие, как левофлоксацин [12] (один из энантиомеров офлоксацина) и моксифлоксацин, без фторхинолонов

просто невозможно представить современный арсенал антибактериальных средств.

Фторхинолоны эффективны при широком круге заболеваний: при тяжелых гнойно-септических процессах, инфекциях дыхательных путей, мочевыводящей системы, кожи и мягких тканей, костей и суставов, печени и желчевыводящих путей, желудочно-кишечного тракта, глаз, центральной нервной системы, а также при инфекциях, передающихся половым путем [1–4]. Фторхинолоны обладают высокой антибактериальной активностью и широким спектром действия благодаря их способности влиять на процессы размножения бактерий путем ингибирования бактериальной топоизомеразы II (ДНК-гиразы) – фермента, отвечающего за разрыв и восстановление двойной спирали ДНК. Крайне важно, что механизм действия фторхинолонов отличен

от механизмов действия других групп антибактериальных препаратов – антибиотиков пенициллинового ряда, а также цефалоспоринов и аминогликозидов, что позволяет эффективно использовать их при инфекционных заболеваниях, вызванных антибиотикоустойчивыми штаммами [1–4].



Левифлоксацин

Один из самых эффективных препаратов в ряду трициклических фторхинолонов – левифлоксацин – оптически активная форма (*S*-изомер) офлоксацина. Антибактериальная активность левифлоксацина в 2 раза выше, чем рацемического офлоксацина, и в 128 раз превышает активность (*R*)-антипода [13]. Левифлоксацин по праву считают препаратом 21 века, поскольку, будучи энантимерно чистым аналогом офлоксацина, он в низких концентрациях воздействует на клинически значимые грамположительные и атипичные микроорганизмы при сохранении высокой активности в отношении многих грамотрицательных бактерий [12].

В Институте органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН и в Уральском федеральном университете имени первого Президента России Б.Н. Ельцина разработаны оригинальные методы получения целого семейства фторхинолонов и предшественников их синтеза, в том числе энантимерно чистых полупродуктов синтеза левифлоксацина, путем кинетического разделения оптических антиподов в реакциях с хиральными реагентами [5, 7, 11]. Научный приоритет исследований, направленных на синтез оптически активного левифлоксацина и его аналогов подтверждается серией публикаций [14–20]. Так, в частности, разработан оригинальный и эффективный метод синтеза (*S*)-7,8-дифтор-2,3-дигидро-3-метил-4Н-[1,4]бензоксазина, ключевого полупродукта в синтезе левифлоксацина [14, 15].

В настоящее время в Институте органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН продолжается синтез новых производных фторхинолонов и их аналогов с целью выявления новых препаратов, перспективных для антибактериальной терапии. Важный элемент этой работы представляет оценка способности новых препаратов ингибировать ДНК-гиразу, поскольку контроль качества при серийном производстве левифлоксацина предполагает определение

параметров ингибирования ДНК-гиразы, что может служить одним из критериев чистоты препарата. Настоящее сообщение посвящено изучению взаимодействия ДНК-гиразы с новыми производными фторхинолонов и других фторсодержащих гетероциклов, а также с серийными образцами левифлоксацина.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы

В качестве источника ДНК-гиразы использовали плазмиды *GyrA*-pET19 и *GyrB*-pET19m, содержащие гены субъединиц А и В ДНК-гиразы соответственно, любезно предоставленные К.В. Севериновым и И.С. Шкундиной (Институт молекулярной генетики РАН). Субстраты для гиразной реакции – релаксированные формы плазмид pBR322 или pНОТ – получены от фирмы «Topogen» (США).

Выделение и очистка ДНК-гиразы

В качестве штамма-хозяина использовали клетки *Escherichia coli* Rosetta(DE3) {*F- ompT hsdSB (rmtB-) gal dcm lacY1 (DE3) pRARE6 (CmR)*} («Novagen», США). Субъединицы ДНК-гиразы, кодируемые плазмидами, содержали шесть остатков гистидина на N-конце, что позволило выделять их с помощью аффинной хроматографии на колонке с Ni-НТА-агарозой.

Клетки, трансформированные плазмидами, выращивали как ночную культуру в 5 мл среды LB, содержащей 150 мг/л ампициллина (A150) и 15 мг/л хлорамфеникола (C15) при 37°C. Ночную культуру центрифугировали, осадок ресуспендировали в 250 мл свежей среды, содержавшей A150 и C15. Клетки выращивали при 37°C до оптической плотности (OD_{550}), равной 0,5, затем добавляли изопропилтио-β-D-галактозид (ИПТГ) до конечной концентрации 1 мМ. Далее клетки растили в течение 18 ч при 17°C, затем собирали центрифугированием при 4000 об/мин в течение 20 мин, промывали буфером ГТЕ (25 мМ Трис-НСl, рН 7,6, 50 мМ глюкоза, 10 мМ ЭДТА) и замораживали на ночь при -85°C. Клетки суспендировали в 15 мл буфера А (20 мМ Трис-НСl, рН 8,0, 500 мМ NaCl, 10% (v/v) глицерин, 1% (v/v) Тритон X-100, 1 мМ 2-меркаптоэтанол) с добавлением ингибиторов протеаз – 1 мМ фенолметилсульфонилфторида (PMSF) и 10 мкг/мл апротинина. Суспензию клеток лизировали ультразвуком на льду и центрифугировали в течение 15 мин при 10000 g. Надосадочную жидкость наносили на колонку с Ni-НТА-агарозой (2 мл), уравновешенную буфером А. Колонку последовательно промывали буфером А, содержащим 10, 30 и 50 мМ имидазола (по 5 мл каждого), целевые белки элюировали тем же буфером,

содержащим 200 мМ имидазола. Фракции, содержащие гиразу А и гиразу В, диализовали против буфера А без Тритона, затем против того же буфера, содержащего 50% глицерина. Выход и чистоту ферментов анализировали в 12% полиакриламидном геле по Лэммли. Выход гиразы А составил 40 мг/л клеточной культуры, гиразы В – около 60 мг/л. Смешивали эквивалентные количества полученных препаратов ДНК-гираз А и В, фасовали порциями по 30–50 мкл, и аликвоты хранили при -80°C в течение нескольких недель без видимой потери активности. (При -18°C активность фермента сохранялась в течение 2–3 сут).

Определение активности ДНК-гиразы

Реакцию проводили в течение 60 мин при 25°C. Реакционная смесь (30 мкл) содержала следующие компоненты: 35 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 24 мМ КСl, 4 мМ MgCl₂, 1.4 мМ АТФ, 5 мМ ДТТ, 1.8 мМ спермидина, 0.1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина. К смеси добавляли по 0.4 мкг смеси субъединиц А и В гиразы и 0.25–0.5 мкг субстрата (релаксированной плазмиды рВR322). Реакцию проводили в термостате при 25°C в течение 60 мин (для множественных образцов использовали 96-луночные планшеты). После окончания реакции экстрагировали пробы равным объемом хлороформа (30 мкл), к водной фазе добавляли 7 мкл смеси 50% додецилсульфата натрия, 25% глицерина и 0.25% бромфенолового синего. Смесь наносили на 1.2% агарозный гель в буфере ТАЕ (40 мМ Трис-ацетат, рН 8.0, 2 мМ ЭДТА) и проводили электрофорез (50 В, 2 ч). Продукты визуализировали в УФ-свете. Активность фермента (%) определяли по интенсивности полосы, соответствующей суперспирализованной форме плазмиды рВR322, и рассчитывали в программе TotalLab v2.01.

Ингибирование ДНК-гиразы фторхинолонами и другими фторсодержащими гетероциклами

Соединения растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). Реакцию проводили в течение 60 мин при 25°C в объеме 30 мкл. Реакционная смесь (30 мкл) содержала следующие компоненты: 35 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 24 мМ КСl, 4 мМ MgCl₂, 1.4 мМ АТФ, 5 мМ дитиотреитол (ДТТ), 1.8 мМ спермидина, 0.1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина и несколько концентраций левофлоксацина или производных фторсодержащих гетероциклов (см. ниже). В контрольные пробы добавляли соответствующий объем ДМСО, но не более 10% объема пробы. К пробам добавляли по 0.4 мкг смеси субъединиц ДНК-гиразы А и В и 0.25–0.5 мкг субстрата (релаксированной плазмиды рВR322). Далее реакцию проводили как описано выше, расчеты проводили в программе TotalLab v2.01.

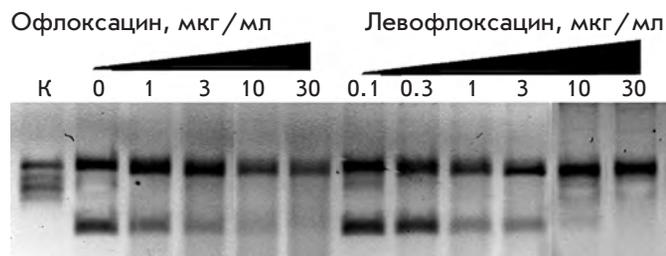


Рис. 1. Ингибирование ДНК-гиразы левофлоксацином и офлоксацином. Цифрами указаны концентрации ингибиторов в пробах. К – контроль (плазида без фермента).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Клеточная мишень фторхинолонов – бактериальная ДНК-гираза – состоит из двух субъединиц с M_r 105 и 95 кДа, кодируемых соответственно генами *gyrA* и *gyrB*, и имеет тетрамерную структуру типа A_2B_2 [1–5]. Хотя функция этого фермента в клетке не ограничивается актом единственного типа (она способна как создавать, так и «зашивать» разрывы в ДНК-цепи), при определении активности *in vitro* обычно оценивают только одну изолированную функцию этого фермента, а именно способность к образованию отрицательных сверхвитков в релаксированных кольцевых ДНК с образованием суперскрученной формы плазмиды. Оценка этого процесса довольно удобна в эксперименте, поскольку субстрат и продукт реакции могут быть разделены и количественно определены с помощью электрофореза в агарозном геле.

Использованный в работе препарат ДНК-гиразы *E. coli* отличался высокой удельной активностью, что позволило использовать его для тестирования фторхинолонов. На первом этапе тестированию подвергался образец левофлоксацина чистотой около 99%. В качестве контроля использовали офлоксацин (рацемическая смесь, левофлоксацин – левовращающий изомер офлоксацина). Офлоксацин, хорошо известный клиницистам, является фторхинолоном первого поколения и применяется более 15 лет [1–4].

На рис. 1 показаны результаты определения ингибирующей активности. Величины I_{50} , рассчитанные по результатам трех независимых опытов, составили 2.50 ± 0.14 мкг/мл и 6.20 ± 0.17 мкг/мл для левофлоксацина и офлоксацина соответственно. Полученные величины соответствуют опубликованным данным [7–10]; более того, соотношения I_{50} для этих соединений указывают на стереоспецифичность ДНК-гиразы. Величина I_{50} для рацемата (офлоксацин) примерно вдвое больше, чем у индивидуального стереоизомера (левофлоксацин), что грубо соответствует его содержанию в рацемической смеси.

Таблица 1. Структурные формулы субстанции левофлоксацина, интермедиатов и полупродуктов синтеза

Структурная формула	Название	Тип соединения	Шифр
	Левофлоксацин (3 <i>S</i>)-9-Фтор-3-метил-10-(4-метилпиперазин-1-ил)-7-оксо-2,3-дигидро-7Н-пиридо[1,2,3- <i>d,e</i>][1,4]-бензоксазин-6-карбоновая кислота, гемигидрат	Субстанция	IOS-001 – IOS-019
	(<i>R,S</i>)-7,8-Дифтор-3-метил-2,3-дигидро-4Н-бензо[<i>b</i>][1,4]-оксазин	Интермедиат	IOS-RS-01, IOS-RS-02
	(3 <i>S</i>)-2,3-Дигидро-3-метил-7,8-дифтор-1,4-бензоксазин	Интермедиат	IOS-S-01, IOS-S-02
	Этиловый эфир (3 <i>S</i>)-(-)-9,10-дифтор-3-метил-7-оксо-2,3-дигидро-7Н-пиридо[1,2,3- <i>d,e</i>][1,4]-бензоксазин-6-карбоновой кислоты	Полупродукт	IOS-Э-01, IOS-Э-02
	(3 <i>S</i>)-(-)-9,10-Дифтор-3-метил-7-оксо-2,3-дигидро-7Н-пиридо[1,2,3- <i>d,e</i>][1,4]-бензоксазин-6-карбоновая кислота	Полупродукт	IOS-K-001, IOS-K-002

Поскольку величина I_{50} для ферментативной реакции является константой, этот показатель может использоваться для контроля качества левофлоксацина. Учитывая, что только один, а именно левовращающий изомер офлоксацина является ингибитором фермента, величина I_{50} может служить критерием чистоты препарата. Наряду с химической и оптической чистотой препарата его биологическая эффективность считается важной характеристикой качества препаратов левофлоксацина.

В табл. 1 приведены структурные формулы левофлоксацина (использовано 19 образцов из опытных партий субстанции), а также ключевых интермедиатов (четыре образца) и полупродуктов (четыре образца) его полупромышленного синтеза, осуществленного в ИОС УрО РАН.

Все 19 образцов субстанции левофлоксацина, соответствующие опытным партиям препарата, имели близкие значения I_{50} (2.4–2.8 мкг/мл), которые при точности используемого метода определения активности (погрешность определения до 20%) можно считать совпадающими. Эти значения соответствуют опубликованным данным для препарата левофлоксацина чистотой 99%, что подтверждают также результаты физико-химического анализа. Из ключевых интермедиатов и полупродуктов синтеза левофлоксацина три образца (рацемический бензоксазин **IOS-RS**, энантимерно чистый бензоксазин **IOS-S** и эфир

IOS-Э) не обладали сколько-нибудь значимой активностью, а активность полупродукта **IOS-K** оказалась примерно на порядок ниже, чем у левофлоксацина (рис. 2).

В то же время при сравнении структурных формул полупродуктов **IOS-Э** и **IOS-K** можно видеть, что они различаются лишь наличием этилированной карбоксильной группы у **IOS-Э**. Важно отметить

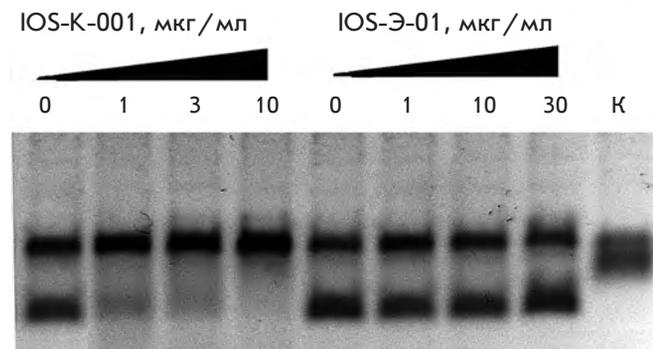
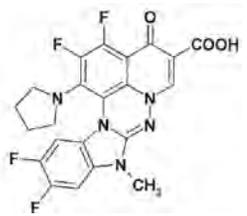
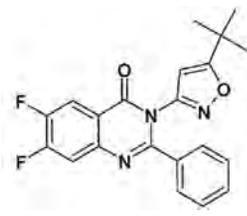
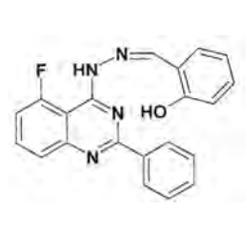
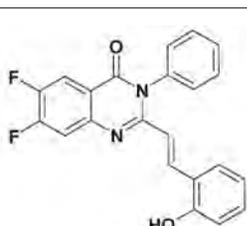
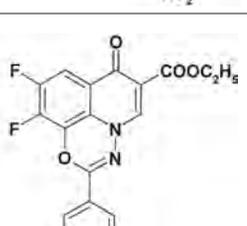
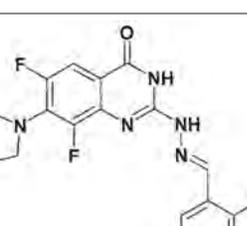
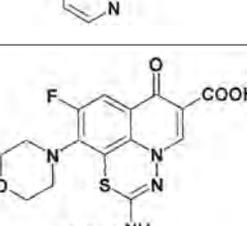
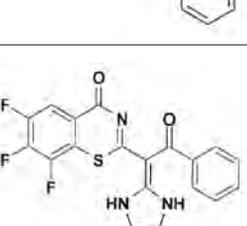
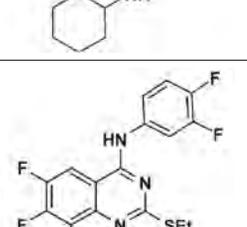
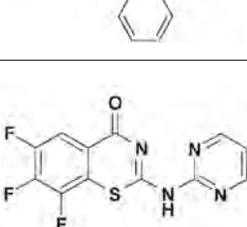
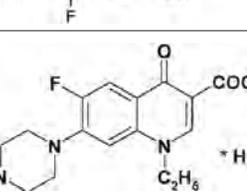
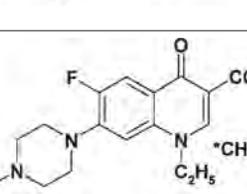


Рис. 2. Ингибирование ДНК-гиразы соединениями **IOS-K-001** и **IOS-Э-01**. Цифрами указаны концентрации ингибиторов в пробах. К – контроль (плазмида без фермента). Условия реакции см. в «Экспериментальной части».

Таблица 2. Ингибирующая активность ряда новых фторхинолонов и фторгетероциклов в отношении ДНК-гиразы

ШИФР/ I ₅₀ , мкг/мл	Структурная формула	ШИФР/ I ₅₀ , мкг/мл	Структурная формула
EV-465 >30		EV-X149 неактивен	
EV-591 неактивен		EV-T150-C неактивен	
EV-452-D неактивен		EV-T156 неактивен	
EV-313-D неактивен		EV-T143-B неактивен	
EV-572 неактивен		EV-N51-B неактивен	
EV-X58-A неактивен		EV-N119-2 неактивен	
IOS-NORFL_01 >11		IOS-PEFL_02 2.8	

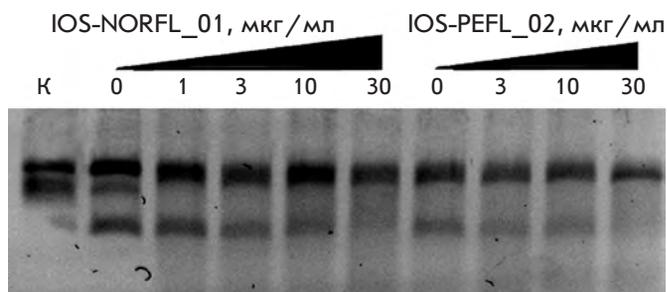


Рис. 3. Ингибирование ДНК-гиразы норфлоксацином **IOS-NORFL_01** и пefлоксацином **IOS-PEFL_02**. Цифрами указаны концентрации ингибиторов в пробах. К – контроль (плазмида без фермента). Условия реакции см. в «Экспериментальной части».

тить, что это единственное различие в структурах обуславливает достаточно заметную ингибирующую активность при наличии свободной карбоксильной группы, и практически полное исчезновение активности при ее этилировании. Этот результат позволяет предполагать функциональную важность заряженной карбоксильной группы в указанном положении для проявления ингибирующей активности и соответствует представлениям о механизме взаимодействия фторхинолонов с ДНК-гиразой, что, безусловно, должно учитываться при дизайне новых, более эффективных ингибиторов фермента.

В работе проведено также тестирование ингибирующей активности в отношении ДНК-гиразы ряда новых производных фторхинолонов и фторсодержащих гетероциклов, синтезированных в ИОС им. И.Я. Постовского УрО РАН. Результаты экспериментов приведены в *табл. 2*.

Как видно из *табл. 2*, подавляющая часть соединений оказалась неактивной. Исключение составляли фторхинолон **EV-465**, активность которого была примерно на два порядка ниже, чем у левофлоксацина, а также известные соединения фторхинолонового ряда – **IOS-NORFL_01** (норфлоксацин) и **IOS-PEFL_02** (пefлоксацин) (*рис. 3, 4*).

Соединение **IOS-NORFL_01** показало незначительное ингибирующее действие, в то время как **IOS-PEFL_02** обладало умеренной активностью, значительно, впрочем, уступавшей активности левофлоксацина. Интересно, что эти соединения отличаются лишь дополнительной метильной группой у **IOS-PEFL_02**, введение которой приводит к увеличению ингибирующей активности примерно на порядок. Это важное обстоятельство, которое должно учитываться в дальнейшей работе по созданию новых производных фторхинолонов.

Таким образом, проведенные эксперименты показали важность оценки ингибирующей активности

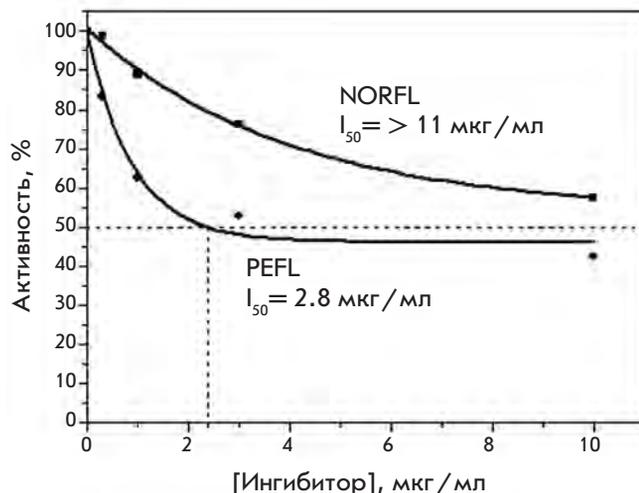


Рис. 4. Определение I_{50} для соединений **IOS-NORFL_01** и **IOS-PEFL_02** по данным *рис. 3*. Величине I_{50} соответствует пересечение пунктирных линий с осью абсцисс.

левофлоксацина в отношении бактериальной ДНК-гиразы как одного из методов контроля качества препарата, наряду с использованием обычных физико-химических методов. С помощью разработанного метода оценено качество 19 образцов опытных партий левофлоксацина, восьми образцов интермедиатов и полупродуктов синтеза, а также 14 новых производных фторхинолонов и их аналогов.

В результате корреляционного анализа «структура–ингибирующее действие» отмечена важность двух структурных элементов молекул для проявления ингибирующей активности: это карбоксильная группа в соединении IOS-К, этерификация которой приводит к потере ингибирующих свойств, и N-метильная группа в соединении IOS-PEFL, элиминация которой также приводит к потере активности соединения. Полученные данные следует принять во внимание при дизайне новых лекарственных препаратов на основе фторсодержащих гетероциклов. ●

Авторы выражают благодарность К.В. Северинову и И.С. Шкундиной (Институт молекулярной генетики РАН) за предоставленные плазмиды *GyrA-pET19* и *GyrB-pET19m*.

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного контракта № 02.522.12.2011 ФЦНТП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. The New Generation of Quinolones / Eds Siporin C., Heifetz C.L., Domagala J.M. New York, London, 1990. 422 p.
2. Shen L.L. Quinolone Antibacterial Agents. Washington: American Soc. Microbiol., 1993. 344 p.
3. Quinolone Antimicrobial Agents, 2nd ed. / Eds Hooper D.S., Wolfson J.S. Washington, 1993.
4. Падейская Е.Н., Яковлев В.П. Фторхинолоны. М.: Биоинформ, 1995. 208 с.
5. Мокрушина Г.А., Чарушин В.Н., Чупахин О.Н. // Химико-фармацевтический журн. 1995. № 1. С. 5–19.
6. Ball P. The Quinolones / Ed. Andriole T.V. San Francisco: Acad. Press, 1998. P. 1–28.
7. Мокрушина Г.А., Носова Э.В., Липунова Г.Н., Чарушин В.Н. // Журн. орг. химии. 1999. Т. 35. № 10. С. 1447.
8. Граник В.Г. Основы медицинской химии. М.: Вузовская книга, 2001.
9. Фурин Г.Г. Фторсодержащие гетероциклические соединения: синтез и применение. Новосибирск: Наука, 2001.
10. Мокрушин В.С., Вавилов Г.А. Основы химии и технологии биоорганических и синтетических медицинских препаратов. Екатеринбург: УГТУ-УПИ, 2004.
11. Nosova E.V., Mochulskaaya N.N., Kotovskaya S.K., Lipunova G.N., Charushin V.N. // Heteroatom Chemistry. 2006. V. 17. № 6. P. 579.
12. Яковлев В.П., Яковлев С.В. // Инфекции и антимикробная терапия. 2004. Т. 6. № 4. (http://old.consilium-medicum.com/media/infektion/04_04/108.shtml)
13. Hayakawa I., Atarashi S., Yokohama S., Imamura M., Sakano K., Furukawa M. // Antimicrob. Agents Chemother. 1986. V. 29. № 1. P. 163–164.
14. Charushin V.N., Krasnov V.P., Levit G.L., Korolyova M.A., Kodess M.I., Chupakhin O.N., Kim M.H., Lee H.S., Park Y.J., Kim K.-C. // Tetrahedron: Asymmetry. 1999. V. 10. P. 2691.
15. Production of (*S*)-benzoxazine derivative and racemization of (*R*)-benzoxazine derivative // Chupakhin O.N., Krasnov V.P., Levit G.L., Charushin V.N., Korolyova M.A., Tzoi E.V., Lee H.S., Park Y.J., Kim M.H., Kim K.Ch. / Патент Японии JP 2000178265. publication date 27.06.2000 (Chem. Abstr., 2000. V. 133. P. 43530).
16. Krasnov V.P., Levit G.L., Bukrina I.M., Andreeva I.N., Sadretdinova L.Sh., Korolyova M.A., Kodess M.I., Charushin V.N., Chupakhin O.N. // Tetrahedron: Asymmetry. 2003. V. 14. P. 1985.
17. Potemkin V.A., Krasnov V.P., Levit G.L., Bartashevich E.V., Andreeva I.N., Kuzminsky M.B., Anikin N.A., Charushin V.N., Chupakhin O.N. // Mendeleev Comm. 2004. P. 69.
18. Krasnov V.P., Levit G.L., Kodess M.I., Charushin V.N., Chupakhin O.N. // Tetrahedron: Asymmetry. 2004. V. 15. № 5. P. 859.
19. Gruzdev D.A., Levit G.L., Krasnov V.P., Chulakov E.N., Sadretdinova L.Sh., Grishakov A.N., Ezhikova M.A., Kodess M.I., Charushin V.N. // Tetrahedron: Asymmetry. 2010. V. 21. P. 936.
20. Levit G.L., Gruzdev D.A., Krasnov V.P., Chulakov E.N., Sadretdinova L.Sh., Ezhikova M.A., Kodess M.I., Charushin V.N. // Tetrahedron: Asymmetry. 2011. V. 22. P. 185.

УДК 576.353.3

Судьба ядрышка в митозе: сравнительный анализ локализации некоторых форм пре-рРНК методом флуоресцентной гибридизации *in situ* в фибробластах мышцы NIH/3T3

К. В. Шишова*, О. О. Жарская, О. В. Зацепина

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

*E-mail: kseniya.shishova@inbox.ru

Поступила в редакцию 10.06.2011 г.

РЕФЕРАТ Ядрышко – основной структурный домен клеточного ядра, содержащий, наряду с белками, значительное количество рибосомных РНК (рРНК) на разных стадиях созревания (пре-рРНК). Вступление клеток млекопитающих в митоз сопровождается прекращением синтеза рРНК, распадом ядрышка и выходом пре-рРНК в цитоплазму. Однако роль цитоплазматической пре-рРНК в митозе до сих пор остается невыясненной, а сравнительный анализ «судьбы» ее различных форм на всех стадиях деления не производился. Основная цель настоящей работы – изучение локализации пре-рРНК, выявляемой зондами к короному участку внешнего транскрибируемого спейсера (5'ВшТС), внутренним транскрибируемым спейсерам (ВнТС1 и ВнТС2), а также к зрелой 28S рРНК, меченных биотином, в митотических фибробластах мышцы NIH/3T3 методом флуоресцентной гибридизации *in situ* и конфокальной лазерной микроскопии. Показано, что при распаде ядрышка и ядерной оболочки в начале митоза разные формы пре-рРНК выходят в цитоплазму, но на хромосомах из материнской клетки в дочерние клетки переносятся ее более процессированные формы. Все формы пре-рРНК и 28S рРНК выявляются в составе цитоплазматических производных ядрышка (nucleolus derived foci, NDF), формирование которых означает начало нуклеологенеза. Однако в «ранних» NDF наиболее отчетливо выявляются менее процессированные пре-рРНК, тогда как «поздние» NDF содержат преимущественно 28S рРНК. Полученные данные говорят о том, что различные формы пре-рРНК материнской клетки могут играть разную роль в формировании дочерних ядрышек, а одной из возможных функций NDF является участие в созревании пре-рРНК, сохраняющейся в цитоплазме при митозе.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ядрышко, митоз, цитоплазматические производные ядрышка (NDF), фибробласты мышцы NIH/3T3, флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ рРНК – рибосомная РНК; 47S пре-рРНК – 47S предшественник рРНК; NDF – цитоплазматические производные ядрышка (nucleolus derived foci); PNB – пренуклеолярные тельца; 5'ВшТС, 3'ВшТС – 5'- и 3'-внешние транскрибируемые спейсеры; ВнТС1, ВнТС2 – первый и второй внутренние транскрибируемые спейсеры; мякРНК – малые ядрышковые РНК; DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндол; FISH – флуоресцентная гибридизация *in situ* (fluorescence *in situ* hybridization).

ВВЕДЕНИЕ

Ядрышко – основной структурный домен клеточного ядра, в котором происходят транскрипция рибосомных генов (рДНК), процессинг (созревание) первичных транскриптов пре-рРНК и сборка рибосомных частиц [1, 2]. У млекопитающих три типа цитоплазматических рРНК – 18S, 5.8S и 28S рРНК, синтезируются в ядрышках в виде единого предшественника, или 47S пре-рРНК. Созревание 47S пре-

рРНК в зрелые рРНК представляет собой сложный многоступенчатый процесс, который, в дополнение к химическим модификациям 18S, 5.8S и 28S рРНК, включает удаление нескольких спейсерных участков, транскрибируемых в составе 47S пре-рРНК – 5'-внешнего транскрибируемого спейсера (5'ВшТС), а также первого (ВнТС1) и второго (ВнТС2) внутренних транскрибируемых спейсеров (рис. 1). Как известно, созревание 18S рРНК продолжает-

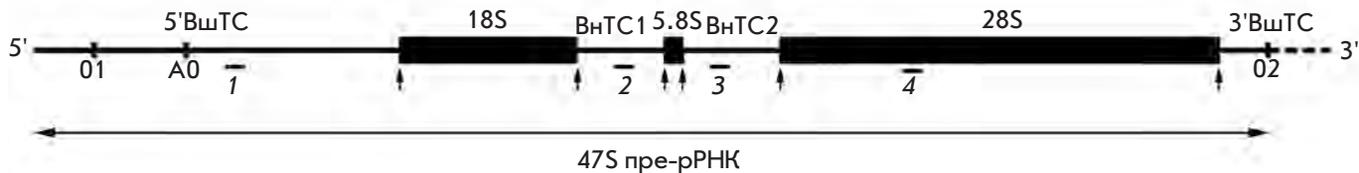


Рис. 1. Структура первичного транскрипта (47S пре-рРНК) мыши и положение зондов, использованных для гибридизации *in situ*. 5'ВшТС – 5'-внешний транскрибируемый спейсер, ВнТС1 – первый внутренний транскрибируемый спейсер; ВнТС2 – второй внутренний транскрибируемый спейсер; 3'ВшТС – 3'-внешний транскрибируемый спейсер. 18S, 5.8S, 28S – фрагменты пре-рРНК, соответствующие зрелым рРНК. Горизонтальные черточки внизу – положение олигонуклеотидных зондов к 5'ВшТС – +2251/+2280 (зонд 1); к ВнТС1 – +6391/+6420 (зонд 2); к ВнТС2 – +7471/+7500 (зонд 3), к 28S рРНК – +9571/9600 (зонд 4). 01, 02, A0 – известные сайты расщепления в составе пре-рРНК мыши.

ся около 20 мин, а 28S рРНК – около 40 мин, поэтому во фракции выделенных ядрышек выявляются не только первичные транскрипты рРНК, но и частично процессированные пре-рРНК разного размера [3]. У мыши наиболее короткоживущим является фрагмент длиной 650 п.н., расположенный с 5'-конца ВшТС – время его полужизни составляет не более 2 мин [4]. Согласно существующим представлениям, у млекопитающих удаление внутренних спейсеров начинается после завершения синтеза и отделения первичного транскрипта пре-рРНК от матричной рДНК, а время их полужизни составляет не менее 30 мин [3–5].

Хорошо известно, что у высших эукариот митоз сопровождается прекращением синтеза пре-рРНК, распадом ядрышка и выходом основных ядрышковых компонентов – белков и рРНК – в цитоплазму [6–10]. Методами биохимического [11, 12] и цитологического анализа [13] показано, что пре-рРНК, синтезированная перед митозом, сохраняется в цитоплазме клеток вплоть до его окончания, хотя роль этой стабильной пре-рРНК в митозе остается пока неизвестной. Недостаточно исследованы также особенности локализации различных форм пре-рРНК в митозе, хотя работы в этом направлении будут способствовать выяснению их роли в восстановлении ядрышек на завершающих стадиях митоза.

Восстановление ядрышек при митотическом делении клеток начинается сразу после расхождения хромосом к полюсам митотического веретена с появления в цитоплазме многочисленных дискретных телец (диаметром 0.2–2.0 мкм), получивших название «дериваты ядрышка» (nucleolus derived foci, NDF). В составе NDF на сегодняшний день описаны многие белки зрелых ядрышек, участвующие в процессинге пре-рРНК (В23/нуклеофозмин, С23/нуклеолин, фибрилларин и другие), U3 и U14 малые ядрышковые РНК (мякРНК), а также зрелые 18S и 28S рРНК.

Методами иммуноцитохимии [13, 14] и путем экспрессии белковых маркеров NDF, слитых с флуоресцентными белками [7], показано, что при завершении митоза количество NDF, содержащих белки раннего процессинга пре-рРНК (например, фибрилларина), постепенно уменьшается. Напротив, белки, участвующие в поздних стадиях процессинга пре-рРНК (например, В23/нуклеофозмин), сохраняются в NDF вплоть до периода G1 следующего клеточного цикла [15]. Наличие в NDF белков и мякРНК, необходимых для процессинга пре-рРНК в интерфазных ядрышках, позволяет высказать предположение, что в NDF могут осуществляться по крайней мере некоторые стадии созревания пре-рРНК, сохраняющейся в клетках при митозе. Однако экспериментально это предположение до сих пор не проверяли, а присутствие разных форм пре-рРНК в «ранних» и «поздних» NDF практически не изучалось.

Основная цель настоящей работы – сравнительный анализ локализации разных форм (интермедиатов) частично процессированной пре-рРНК и 28S рРНК на последовательных стадиях митоза в фибробластах мыши линии NIH/3T3 методом флуоресцентной гибридизации *in situ* и конфокальной лазерной микроскопии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культура клеток

Фибробласты мыши линии NIH/3T3 приобретены в Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН и свободны от микоплазмы. Клетки выращивали в среде DMEM («ПанЭко», Россия), содержащей 10% эмбриональной сыворотки теленка («HyClone», США), 2 мМ L-глутамин, антибиотики пенициллин и стрептомицин (по 250 ЕД каждого), при 37°C и 5% CO₂ и пересаживали дважды в неделю.

Флуоресцентная гибридизация *in situ*

В работе использовали олигонуклеотидные зонды, меченные с 5'-конца биотином и специфически выявляющие следующие участки 47S пре-рРНК мыши: коровый фрагмент 5'-внешнего транскрибируемого спейсера (5'ВшТС, зонд 1) – 5'aga gag aga csg atg csg-asa cac sga tgc (+2251/+2280); первый внутренний транскрибируемый спейсер (ВнТС1, зонд 2) – 5'aaa-cst csg cgc cgg aac gcg asa gct agg (+6391/+6420); второй внутренний транскрибируемый спейсер (ВнТС2, зонд 3) – 5'cag asa acc gca ggc gas cga csg gcc (+7471/+7500); фрагмент 28S рРНК (зонд 4) – 5'gag-gga acc agc tac tag atg gtt cga tta (+9571/+9600). Синтез зондов осуществлен фирмой «Синтол» (Россия); концентрация зондов в стоковых растворах составляла около 2 мкг/мкл. Положение зондов относительно 47S пре-рРНК мыши показано на *рис. 1*. Из *рис. 1* видно, что зонд 1 выявлял менее процессированную форму пре-рРНК, зонды 2 и 3 могли гибридизоваться как с длинной, так и с более короткими (т.е. более процессированными) формами пре-рРНК, а зонд 4 выявлял, в основном, зрелую 28S рРНК, но мог гибридизоваться и с незрелой пре-рРНК.

Клетки, выращенные на покровных стеклах, промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ, 140 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 1,5 мМ KH_2PO_4 и 8,1 мМ Na_2HPO_4 , pH 7.2–7.4) и фиксировали 4% раствором формалина («MP Biomedicals, Inc.», Франция) на ФСБ 30 мин при комнатной температуре. Промывали ФСБ (3 × 5 мин), обрабатывали 0.5% Тритоном X-100 (10 мин при 4°C), промывали ФСБ, а затем двукратным стандартным солевым буфером (2×SSC, 0.3 М NaCl, 0.03 М $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, pH 7.0) 5 мин.

Гибридизационная смесь содержала 50% деионизованного формамида («Sigma», США), 10% декстран-сульфата («Loba Chemie, Fischamend», Австрия), 5% 20×SSC (3 М NaCl, 0.3 М $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, pH 7.0) и 8 нг/мкл олигопроб. Гибридизацию проводили во влажной камере в течение 16 ч при 42°C. Затем клетки последовательно промывали 50% формамидом («Panreac», Испания) на 2×SSC (3 × 10 мин) при 42°C, 2×SSC при 42°C (10 мин) и 2×SSC (10 мин) при комнатной температуре. Места гибридизации выявляли с помощью авидина, конъюгированного с родамином («Roche», Швейцария), при разведении 1 : 200 в буфере, содержащем 4×SSC (0.06 М NaCl, 0.06 М $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, pH 7.0), в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем клетки промывали 4×SSC (10 мин) и ФСБ (3 × 10 мин). Хроматин и хромосомы окрашивали красителем DAPI (1 мкг/мл, 4',6-diamidino-2-phenylindole, «Sigma») в течение 10 мин. Клетки заключали в Мовиол («Calbiochem», США) и изучали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM510 DuoScanMETA («Carl Zeiss»,

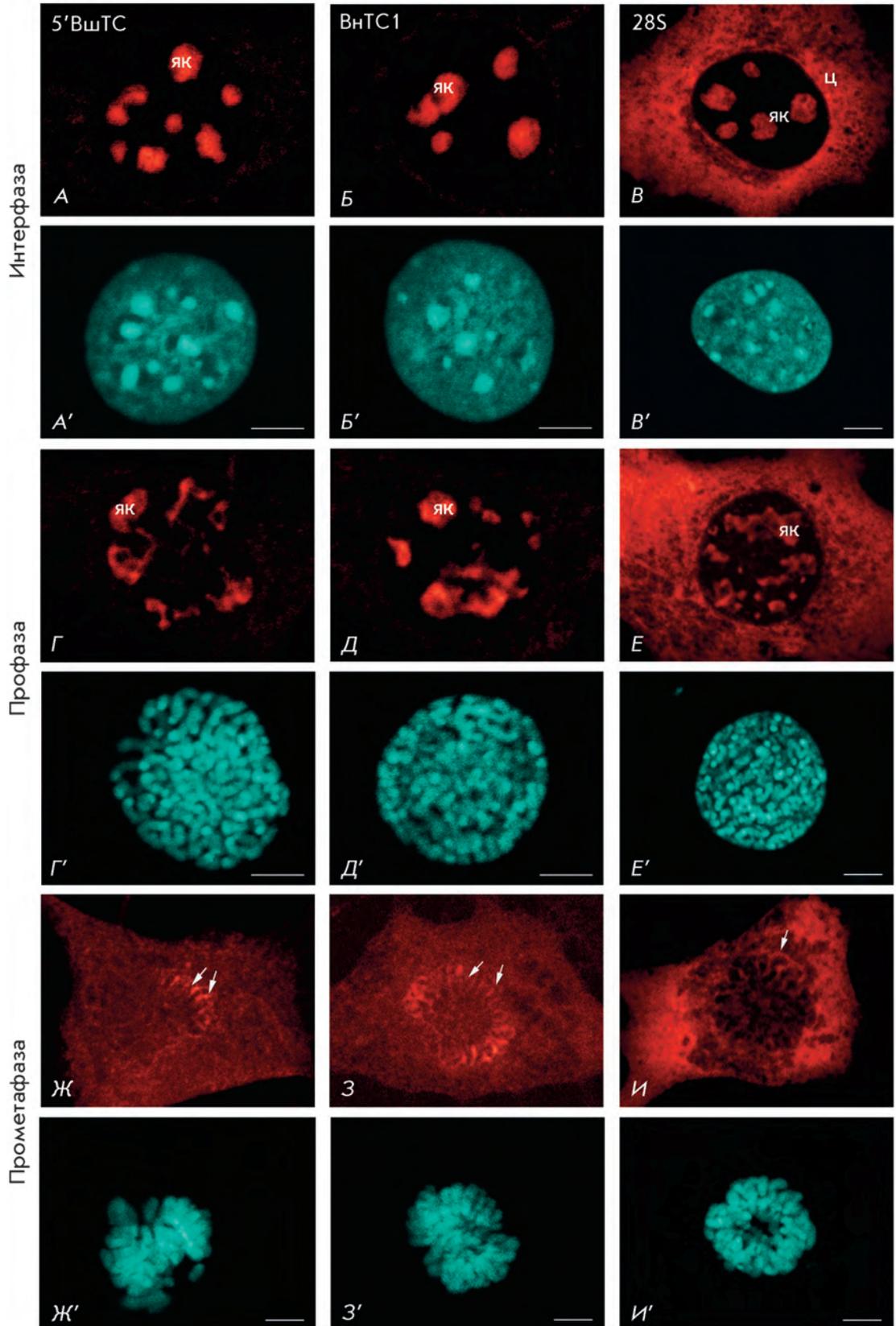
Германия), оснащенного аргоновым (Ar) и гелий-неоновым (He-Ne) лазерами, используя иммерсионный объектив Plan-Apochromat 63×/ЧА (числовая апертура) 1.40. Для контроля фиксированные клетки обрабатывали РНКазой А (200 мкг/мл) на ФСБ в течение 30 мин при 37°C как подробно описано ранее [16]. Обработка РНКазой А полностью блокировала появление флуоресцентных сигналов в ядрышках в интерфазе, а также в митотических клетках после проведения FISH (не иллюстрировано). В контроле и опыте на каждую из стадий нами проанализировано не менее 20 клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На *рис. 2* показана локализация пре-рРНК и 28S рРНК в интерфазных клетках NIH/3T3. Видно, что все формы пре-рРНК выявляются только в ядрышках (*рис. 2А,Б*), а 28S рРНК присутствует как в ядрышке, так и в цитоплазме в зрелых рибосомах (*рис. 2В*). Эти наблюдения хорошо соответствуют данным, опубликованным другими авторами [5, 7, 14], однако отличаются более яркими и четкими гибридизационными сигналами. Мы полагаем, что это связано как с эффективностью мечения олигонуклеотидных зондов, так и с условиями постановки реакции FISH, включая параметры отмычки в буферах, которые позволяют удалять несвязанные зонды и тем самым уменьшать фоновое (неспецифическое) свечение.

Клетки на начальной стадии митоза – в профазе – мы идентифицировали по наличию длинных конденсированных хромосом, отчетливо выявляемых красителем DAPI в ядрах (*рис. 2Г'–Е'*). Известно, что в профазе все белки, участвующие в процессинге пре-рРНК, выходят из ядрышек в ядро и диффузно располагаются между хромосомами [9, 16–18]. К таким белкам, в частности, относятся фибрилларин (фактор раннего процессинга пре-рРНК) [19], В23/нуклеофозмин (фактор сборки рибосом) [20] и SURF-6 (фактор позднего процессинга пре-рРНК) [16, 17]. Результаты настоящей работы показывают, что, в отличие от белков, незрелые рРНК, выявляемые зондами к 5'ВшТС (*рис. 2Г*), ВнТС1 (*рис. 2Д*), ВнТС2 (не иллюстрировано), а также к 28S рРНК (*рис. 2Е*), в профазе располагаются преимущественно в области ядрышек и практически отсутствуют в ядре. Нам не удалось обнаружить различий в локализации пре-рРНК, выявляемых зондами к ВнТС1 и ВнТС2. Различия в поведении пре-рРНК и белков, участвующих в ее созревании, при распаде ядрышка до сих пор описаны не были. Логично предположить, что они отражают частичное разрушение комплексов пре-рРНК с белками, сопровождающее прекращение процессинга пре-рРНК, синтезированной до начала или в самом начале митоза.

Рис. 2. Выявление пре-рРНК в клетках NIH/3T3 методом флуоресцентной гибридизации *in situ* с зондами к 5'ВшТС (зонд 1) (А, Г, Ж), ВнТС1 (зонд 2) (Б, Д, З) и 28S рРНК (зонд 4) (В, Е, И) в интерфазе (А–В), профазе (Г–Е) и прометафаза (Ж–И) митоза. А–И – локализация пре-рРНК и 28S рРНК; А'–И' – окраска хроматина в интерфазе и хромосом в митозе красителем DAPI. як – ядрышки; ц – цитоплазма; стрелки – перихромосомный материал. Масштабные линии 5 мкм.



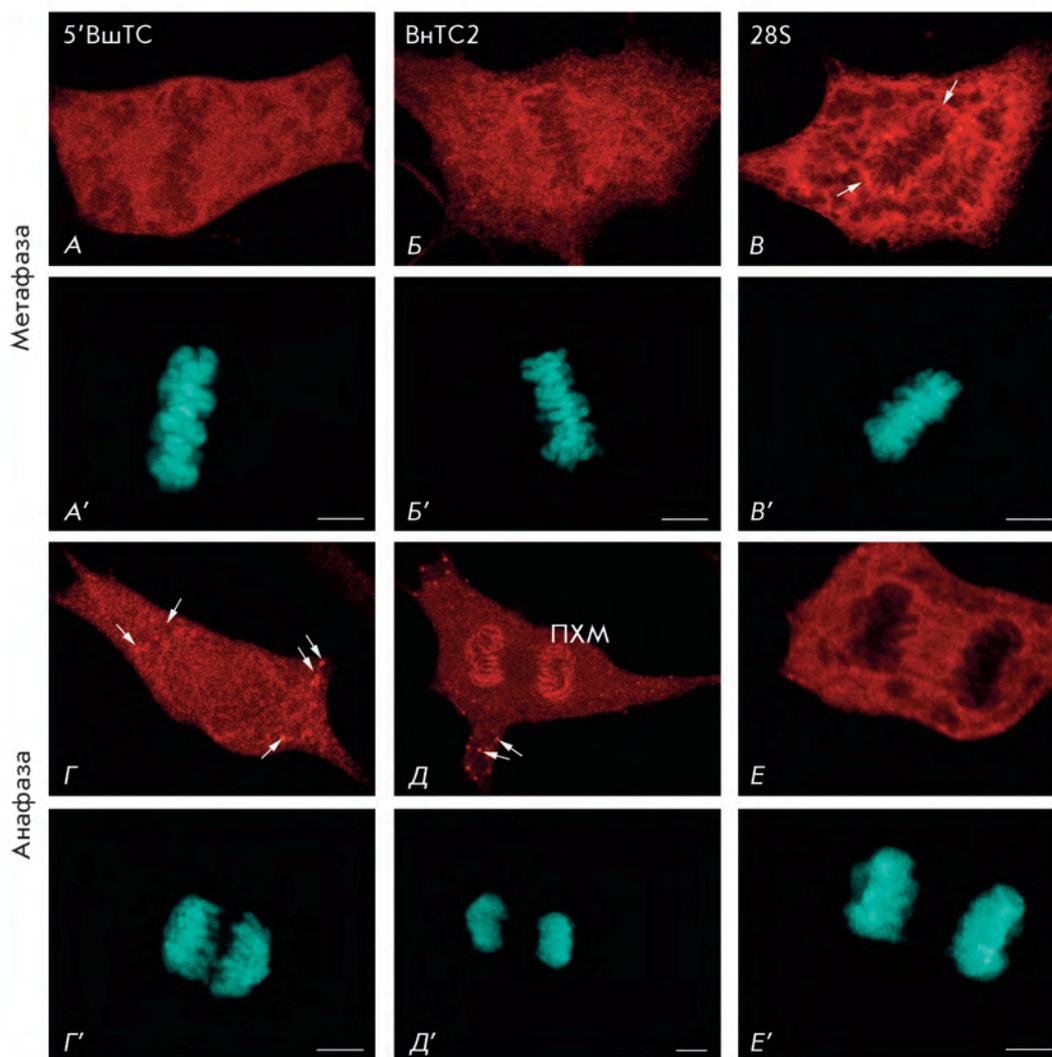


Рис. 3. Выявление пре-рРНК в клетках NIH/3T3 с зондами к 5'ВшТС (зонд 1) (А, Г) и ВнТС2 (зонд 3) (Б, Д) и 28S рРНК (зонд 4) (В, Е) методом FISH в метафазе (А–В) и анафазе (Г–Е) митоза. А–Е – локализация пре-рРНК и 28S рРНК; А'–Е' – окраска хроматина и хромосом красителем DAPI. ПХМ – перихромосомный материал; стрелки – цитоплазматические дериваты ядрышка (Г, Д); ПХМ (В). Масштабные линии 5 мкм.

Распад ядерной оболочки означает переход клетки из профазы в прометафазу и проявляется в дополнительной конденсации хромосом и изменении контура, занимаемой ими области. Известно, что в прометафазе завершается распад ядрышка, а большинство ядрышковых белков выходит в цитоплазму [15]. Согласно результатам нашей работы, в прометафазе все формы пре-рРНК отчетливо проявляются в цитоплазме и на поверхности хромосом (рис. 2Ж,З). Однако флуоресцентные сигналы, проявляемые зондом к 5'ВшТС, присутствовали на поверхности лишь некоторых хромосом (рис. 2Ж), тогда как сигналы, выявляемые зондами к ВнТС1 (рис. 2З) и ВнТС2 (не иллюстрировано), видны на поверхности всех хромосом. Аналогичную закономерность наблюдали также на последующей стадии митоза – в метафазе, когда хромосомы формируют характерную пластинку в центре клетки (рис. 3А–В'). Однако различия в ло-

кализации разных форм пре-рРНК особенно выражены в анафазе, когда хромосомы расходятся к полюсам веретена (рис. 3Г–Е'). Сравнение рис. 3Г и 3Д показывает, что зонд к ВнТС2 ярко окрашивает поверхность хромосом, тогда как зонд к 5'ВшТС с поверхностью хромосом практически не гибридизуется. Эти наблюдения позволяют заключить, что, в отличие от более зрелых (коротких) форм пре-рРНК, выявляемых зондами к ВнТС1 и ВнТС2, менее зрелая пре-рРНК, обнаруживаемая зондом к 5'ВшТС, не переносится хромосомами из материнской в дочерние клетки.

Распад ядрышка в профазе приводит к выходу в цитоплазму не только непротранскрибированных форм пре-рРНК, но и 28S рРНК (рис. 2Е). Поэтому, начиная с ранней прометафазы, метод FISH не позволяет различить 28S рРНК ядрышкового и цитоплазматического происхождения. В поздней прометафа-

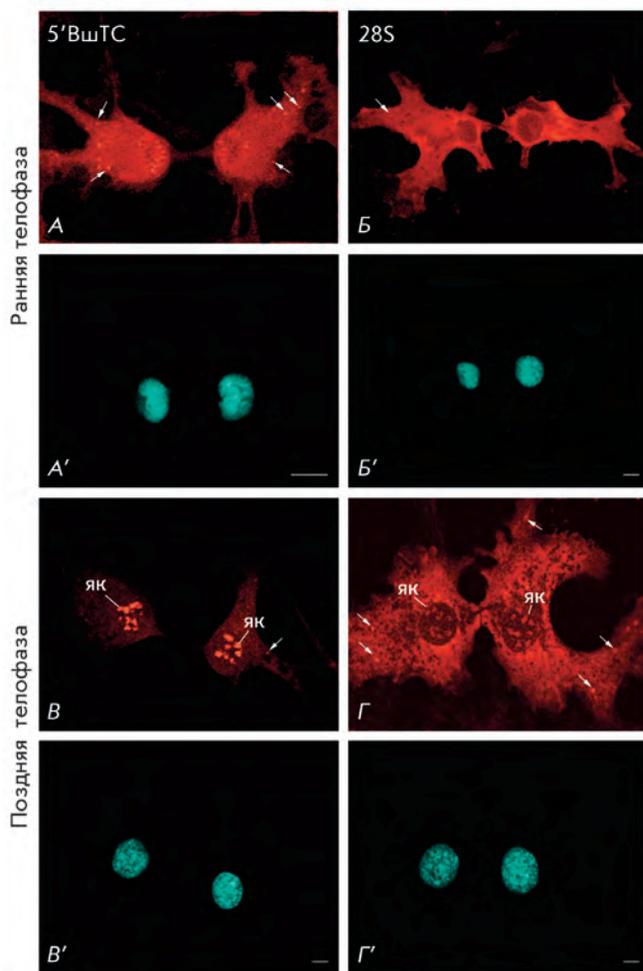


Рис. 4. Выявление пре-рРНК в клетках NIH/3T3 с зондами к 5'ВшТС (зонд 1) (А, В) и 28S рРНК (зонд 4) (Б, Г) методом FISH в ранней телофазе (А, Б) и поздней телофазе (В, Г) митоза. А–Г – локализация пре-рРНК и 28S рРНК; А'–Г' – окраска хроматина и хромосом красителем DAPI. як – ядрышки; стрелки – NDF. Масштабные линии 10 мкм.

зе (рис. 2И), метафаза (рис. 3В) и анафаза (рис. 3Е) FISH-сигналы, выявляемые зондом к 28S рРНК, располагаются в цитоплазме. Кроме того, во многих клетках более интенсивные сигналы видны на поверхности хромосом в виде перихромосомного материала (рис. 3В,Е). Присутствие перихромосомного материала, выявляемого пробой к 28S рРНК, может объясняться наличием как зрелой пре-рРНК, так и незрелой 28S рРНК. Это предположение находится в соответствии с результатами электронно-микроскопического анализа митотических хромосом *in situ*, согласно которым на поверхности хромосом находятся РНП-частицы, по размерам соответствующие рибосомам. Они представляют собой один

из основных структурных компонентов так называемого перихромосомного материала, или слоя [21]. Известно, что ядрышковые белки, входящие в состав перихромосомного материала, используются для построения ядрышек дочерних клеток. Напротив, белковый материал, не входящий в состав перихромосомного слоя, в этом процессе, скорее всего, не участвует [22–24]. Можно предположить, что аналогичная закономерность существует и на уровне различных форм пре-рРНК, т.е. менее процессированные формы пре-рРНК (например, формы, выявляемые зондом к 5'ВшТС) в состав формирующихся ядрышек не включаются.

Согласно современным представлениям, одна из наиболее ранних стадий восстановления ядрышка в митозе у млекопитающих соответствует образованию NDF – цитоплазматических телец, основным компонентом которых являются белки, участвующие в процессинге рРНК [18]. Однако в клетках как животных, так и растений в составе NDF описаны также некоторые формы рРНК, включая зрелые рРНК и пре-рРНК [7, 13, 15]. Результаты, полученные в настоящей работе, однозначно говорят о том, что в клетках мыши NDF также содержат пре-рРНК, хотя характер мечения NDF зондами к разным формам пре-рРНК различается на разных стадиях митоза. «Ранние» NDF, т.е. NDF в анафаза (рис. 3Г'–Е') и начале телофаза (рис. 4А'), преимущественно метятся зондом к 5'ВшТС (рис. 3Г; 4А), но практически не метятся зондом к 28S рРНК (рис. 3Е; 4Б). Напротив, в поздней телофаза и в периоде G1 (рис. 4В',Г') NDF выявляются зондом к 28S рРНК (рис. 4Г), но практически не метятся зондами к 5'ВшТС (рис. 4В), ВшТС1 и ВшТС2 (не иллюстрировано). Примечательно, что «поздние» NDF, выявляемые зондом к 28S рРНК (рис. 4Г), имеют более крупные размеры, чем NDF, которые выявляются на той же стадии митоза зондом к 5'ВшТС (рис. 4В).

Эти наблюдения позволяют заключить, что на завершающих стадиях митоза состав NDF постепенно изменяется: из них исчезают менее процессированные пре-рРНК, но сохраняются или накапливаются более зрелые рРНК. Эти наблюдения свидетельствуют в пользу участия NDF в процессинге пре-рРНК, сохраняющейся при клеточном делении. Необходимо отметить, что NDF не содержат рДНК и потому не способны к синтезу 47S пре-рРНК [15]. NDF – структуры, более короткоживущие, чем ядрышки, и если процессинг пре-рРНК в них действительно происходит, то только в ограниченный отрезок времени, совпадающий с окончанием митоза. Биологический смысл этого явления может заключаться в рациональном использовании пре-рРНК, синтезированной до митоза, и в обеспечении клетки допол-

нительными рибосомами на стадии активного роста после деления.

Структурами, участвующими в формировании ядрышек на завершающих стадиях митоза, являются также пренуклеолярные тельца (PNB – pre-nucleolar bodies), называемые также проядрышками или предядрышками [15]. Подобно NDF, пренуклеолярные тельца представляют собой дискретные образования размером до 1 мкм, содержащие ядрышковые факторы процессинга рРНК. В отличие от NDF, эти тельца формируются не в цитоплазме, а в ядрах дочерних клеток [25, 26]. Основные маркеры этих телец – белки, и вопрос о присутствии различных форм пре-рРНК и зрелых рРНК в пренуклеолярных тельцах изучен плохо. Тем не менее показано, что пренуклеолярные тельца клеток HeLa и СМТЗ (зеленая мартышка), а также клеток растений (*Pisum sativum* и *Allium cepa*) могут содержать 32S пре-рРНК и зрелые 28S рРНК, хотя присутствие 18S рРНК в пренуклеолярных тельцах не очевидно ([15], таблица и ссылки там). Наши наблюдения показали, что в клетках NIH/3T3 пренуклеолярные тельца гибридизуются с теми же зондами, что и NDF, хотя «ранние» проядрышки практически не выявляются зондом к 28S рРНК (рис. 4Б,Б'), то есть, по-видимому, ее не содержат. Однако особенности состава рРНК в пренуклеолярных тельцах на разных стадиях существования требуют специального изучения. На цитологическом уровне эта задача может быть решена

только после разработки подходов, позволяющих сочетать высокочувствительную гибридизацию *in situ* с зондами к различным последовательностям пре-рРНК с выявлением маркерных белков пренуклеолярных телец.

ВЫВОДЫ

Предложена методика высокочувствительного выявления разных форм пре-рРНК и зрелой 28S рРНК в митотических фибробластах мыши NIH/3T3 с использованием олигонуклеотидных зондов, меченных биотином. Показано, что пре-рРНК дольше сохраняется в распадающихся ядрышках, чем белки, участвующие в ее процессинге, и не деградирует в митозе. На хромосомах из материнской в дочерние клетки переносятся лишь некоторые формы пре-рРНК. Пре-рРНК и 28S рРНК выявляются в составе цитоплазматических ядрышковых дериватов (NDF) сразу после их образования в анафазе или ранней телофазе. Однако незрелая пре-рРНК исчезает из состава NDF раньше 28S рРНК. Это наблюдение свидетельствует в пользу участия NDF в процессинге пре-рРНК, сохраняющейся в цитоплазме клеток при митозе. ●

Настоящая работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (государственные контракты № 14.740.11.0121 и 14.740.11.0925).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Sirri V., Urcuqui-Inchima S., Roussel P., Hernandez-Verdun D. // *Histochem. Cell. Biol.* 2008. V. 129. P. 13–31.
- Henras A.K., Soudet J., Gérus M., Lebaron S., Caizergues-Ferrer M., Mougín A., Henry Y. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2008. V. 65. P. 2334–2359.
- Wang M., Pestov D.G. // *Nucl. Acids Res.* 2011. V. 39. P. 1811–1822.
- Kent T., Lapik Y.R., Pestov D.G. // *RNA.* 2009. V. 15. P. 14–20.
- Lazdins I.B., Delannoy M., Sollner-Webb B. // *Chromosoma.* 1997. V. 105. P. 481–495.
- Gautier T., Dauphin-Villemant C., André C., Masson C., Arnoult J., Hernandez-Verdun D. // *Exp. Cell Res.* 1992. V. 200. P. 5–15.
- Dundr M., Misteli T., Olson M.O. // *J. Cell. Biol.* 2000. V. 150. P. 433–446.
- Hernandez-Verdun D. // *The nucleolus.* N.Y.: Kluwer Acad./Plenum Publ., 2004. P. 41–57.
- Leung A.K.L., Lamond A.I. // *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 2004. V. 13. P. 39–54.
- DiMario P.J. // *Int. Rev. Cytol.* 2004. V. 239. P. 99–178.
- Piñol-Roma S. // *Mol. Biol. Cell.* 1999. V. 10. P. 77–90.
- Okuwaki M. // *J. Biochem.* 2008. V. 143. P. 441–448.
- Dundr M., Olson M.O. // *Mol. Biol. Cell.* 1998. V. 9. P. 2407–2422.
- Beven A.F., Lee R., Razaz M., Leader D.J., Brown J.W., Shaw P.J. // *J. Cell. Sci.* 1996. V. 109. P. 1241–1251.
- Жарская О.О., Зацепина О.В. // *Цитология.* 2007. Т. 49. С. 355–369.
- Гурченков В.В., Ползиков М.А., Магуолас К., Романова Л.Г., Зацепина О.В. // *Биоорг. химия.* 2006. Т. 31. С. 578–585.
- Magoulas C., Zatssepina O.V., Jordan P.W., Jordan E.G., Fried M. // *Eur. J. Cell. Biol.* 1998. V. 75. P. 174–183.
- Angelier N., Tramier M., Louvet E. // *Mol. Biol. Cell.* 2005. V. 16. P. 2862–2871.
- Turner A.J., Knox A.A., Prieto J. // *Mol. Cell. Biol.* 2009. V. 29. P. 3007–3017.
- Huang N., Negi S., Szebeni A., Olson M.O.J. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 5496–5502.
- Chentsov Yu.S. // *Russ. J. Dev. Biol.* 2000. V. 31. P. 388–399.
- Hernandez-Verdun D. // *Histochem. Cell. Biol.* 2006. V. 125. P. 127–137.
- Hernandez-Verdun D. // *Histochem. Cell. Biol.* 2006a. V. 126. P. 135–148.
- Olson M.O., Dundr M. // *Histochem. Cell. Biol.* 2005. V. 123. P. 203–216.
- Raska I., Shaw P.J., Cmarko D. // *Int. Rev. Cytology.* 2006. V. 255. P. 177–235.
- Hernandez-Verdun D. // *Nucleus.* 2011. V. 2. P. 189–194.

УДК 579.841.11:579.861.2:576.8.097.37:771.53:631.828

Влияние хлорида натрия на агрегацию мероцианина 540 и фотосенсибилизированную инактивацию *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*

Т. А. Шмиголь¹, В. А. Бехало^{2*}, Е. В. Сысолятина², Е. В. Нагурская², С. А. Ермолаева², А. Я. Потапенко¹

¹Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ и СР РФ, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1

²Федеральное государственное бюджетное учреждение Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи МЗ и СР РФ, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

*E-mail: bekhalo@gamaleya.org

Поступила в редакцию 07.07.2011 г.

РЕФЕРАТ Мероцианин 540 (МЦ540) используется в качестве фотосенсибилизатора (ФС) для инактивации бактерий. Известно, что в дистиллированной воде МЦ540 находится в мономерной и димерной формах, а при добавлении солей формируются крупные агрегаты, обнаруживаемые методом резонансного светорассеяния (РСР). Способностью к фотогенерации синглетного кислорода обладают только мономеры МЦ540. В настоящей работе изучено влияние агрегатного состояния 25 мкМ МЦ540 на скорость фотосенсибилизированной (546 нм) инактивации *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*. С этой целью бактерии облучали в дистиллированной воде и в 0.25 М растворе NaCl, где ФС находился в основном в форме крупных агрегатов. Показано, что в присутствии соли скорость гибели *P. aeruginosa* была в 10 раз, а *S. aureus* – в 30 раз выше, чем в дистиллированной воде. Одновременно в солевом растворе фотоокисление МЦ540 ускорялось примерно в 30 раз. Таким образом, агрегация МЦ540 в присутствии 0.25 М NaCl способствовала значительно повышению эффективности фотосенсибилизированной инактивации *P. aeruginosa* и *S. aureus*. Полученные данные указывают на возможность переключения механизма фотосенсибилизации, индуцированного добавлением соли, с фотогенерации МЦ540 синглетного кислорода на свободнорадикальный.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА фотодинамическая антимикробная терапия, мероцианин 540, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ КОЕ – колониеобразующая единица; ККА – критическая концентрация агрегации; МЦ540 – мероцианин 540; РСР – резонансное светорассеяние; ФС – фотосенсибилизатор.

ВВЕДЕНИЕ

Поиск эффективных способов антибактериальной защиты привел к созданию антимикробной фотодинамической терапии. Впервые фотодинамический эффект был описан Раабом, а термин «фотодинамическая реакция» ввел Таппейнер в 1900 и 1904 гг. соответственно (цит. по [1]). Фотодинамическая инактивация бактерий основана на воздействии света в присутствии фотосенсибилизаторов (ФС) и молекулярного кислорода. Под действием света ФС активируется, производя свободные радикалы или синглетный кислород, которые становятся губительными для инфекционных агентов.

Известно, что МЦ540 способен инактивировать инфекционные агенты [2–5], при этом протекают два типа фотодинамических реакций: реакции типа I, в которых ФС в триплетном возбужденном состоянии взаимодействует непосредственно с субстратом, а не с молекулярным кислородом. В таких реакциях происходит перенос электрона (или водорода) между молекулой ФС в триплетном возбужденном состоянии и субстратом в основном состоянии. В зависимости от реагирующей пары возможен перенос как с субстрата на сенсibilизатор, так и с ФС на субстрат. В результате образуются свободные радикалы, а кислород подключается к этим реакциям

на более поздних стадиях, приводя к фотоокислению субстрата [6].

В реакциях типа II первичным является взаимодействие ФС в триплетном возбужденном состоянии с молекулярным кислородом. В результате такого взаимодействия образуется возбужденный синглетный кислород или супероксид-анион-радикал. Главная роль в последующих реакциях чаще всего принадлежит синглетному кислороду, который взаимодействует с субстратом, окисляя его. Также может происходить отрыв электрона от возбужденного ФС с образованием супероксид-аниона. В последующих реакциях окисления субстрата участвуют уже супероксид-анион и образующиеся из него другие активные формы кислорода [6].

В предварительных исследованиях *in vitro* было показано, что агрегаты МЦ540 выцветают значительно быстрее, чем мономеры и димеры [7, 8]. Наиболее чувствительным и селективным методом изучения агрегации красителей является резонансное светорассеяние (РСР), т.е. резкое усиление рэлеевского рассеяния света в области полосы поглощения агрегированных молекул красителей. Оно свойственно растворам сильно поглощающих хромофоров, образующих крупные агрегаты, в которых устанавливается экситонное взаимодействие между π -электронными системами молекул красителя [9].

В нашей работе описано влияние хлорида натрия на агрегацию МЦ540, скорость его фотовыцветания и фотосенсибилизированную инактивацию бактерий *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы

Мероцианин 540 (МЦ540, «Sigma», США); NaCl «х. ч.» («РЕАХИМ», Россия). Маточный раствор МЦ540 (10^{-3} М) готовили в дистиллированной воде в день опыта. Рабочие 25 мкМ растворы получали путем разведения маточного раствора в воде или в 0.25 М растворе NaCl.

Растворы мероцианина 540 и суспензии микроорганизмов облучали светом ртутно-кварцевой лампы ДРШ-250 (Зеленоград, Россия). Монохроматический свет выделяли при помощи стеклянного светофильтра «546 нм» (Россия).

Интенсивность света измеряли при помощи калиброванного для 546 нм фотодиода ИМ-1-2 (Россия). Растворы МЦ540 облучали при непрерывном перемешивании на магнитной мешалке в кюветах толщиной 1 см при боковом освещении и температуре 23°C.

Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре Shimadzu UV-1601 РС (Япония).

Спектры резонансного светорассеяния регистрировали на спектрофлуориметре Shimadzu RF-1501 (Япония). Для регистрации спектров использовали кварцевые кюветы толщиной 1 см. В измеренные спектры РСР вносили поправки на эффекты внутреннего светофильтра и на чувствительность прибора согласно методу, описанному в работе Тихомирова и соавт. [10].

Культуры клеток

В работе использовали клинический изолят штамма 78 *S. aureus* (Sa78) и штамма 104 *P. aeruginosa* (Pa104) из коллекции микроорганизмов ФГБУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздравсоцразвития России.

Приготовление суспензии клеток

S. aureus и *P. aeruginosa* инкубировали в течение 12 ч при 37°C в питательном бульоне Brain Heart Infusion («Difco», США), разводили в фосфатно-солевом буфере до достижения оптической плотности (D_{600}), равной 1, что соответствует концентрации 10^9 КОЕ/мл. Бактериальную суспензию (1 мл) дважды отмывали центрифугированием в стерильной дистиллированной воде (7000 об/мин, 3 мин) и ресуспендировали в 10 мл стерильной дистиллированной воды.

Для получения облучаемых образцов 50 мкМ раствор МЦ540 в дистиллированной воде смешивали в соотношении 1 : 1 с бактериальной культурой в дистиллированной воде. Образец 25 мкМ МЦ540 в солевом растворе готовили, смешивая 100 мкМ МЦ540, 1 М NaCl и суспензию бактерий в соотношении 1 : 1 : 2 соответственно. До облучения образец МЦ540 с итоговой концентрацией 25 мкМ инкубировали с клетками в течение 10 мин в темноте при комнатной температуре. После облучения делали серию десятикратных разведений образцов на агаризованной среде ГРМ-1 (Оболensk, Россия) и разливали в чашки Петри. Образотанные и контрольные образцы инкубировали в термостате при 37°C. Выросшие колонии подсчитывали через 24 ч. Бактерицидный эффект определяли как соотношение выживших бактерий в опыте и в контроле.

Кинетика фотовыцветания МЦ540 и фотоинактивации бактерий

Кинетический анализ фотовыцветания 25 мкМ МЦ540 в дистиллированной воде и в растворе хлорида натрия (0.25 М) проведен на начальном участке дозовой зависимости (соответствующей моноэкспоненциальной зависимости распада ФС), построенной в полулогарифмических координатах. Константа фотовыцветания ($m^2/кДж$) найдена по формуле: $k = \ln(D/D_0)/F$, где D_0 и D – оптическая плотность при длине волны 518 нм в начальный момент времени и при дозе облучения F ($кДж/м^2$) соответственно.

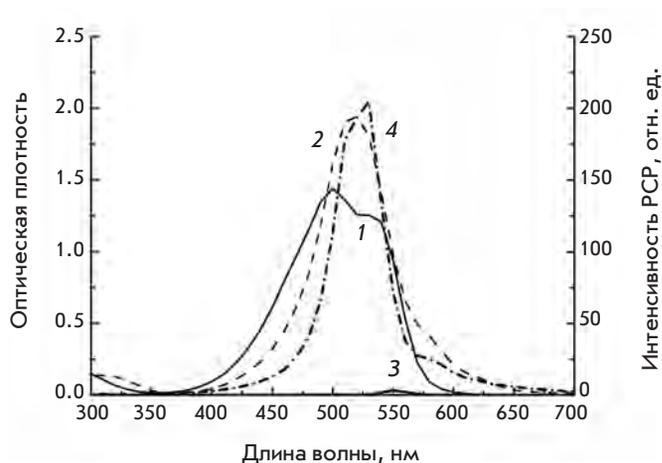


Рис. 1. Спектры поглощения (1, 2) и резонансного светорассеяния (3, 4) раствора МЦ540 (25 мкМ) в дистиллированной воде (1, 3) и в 0.25 М NaCl (2, 4).

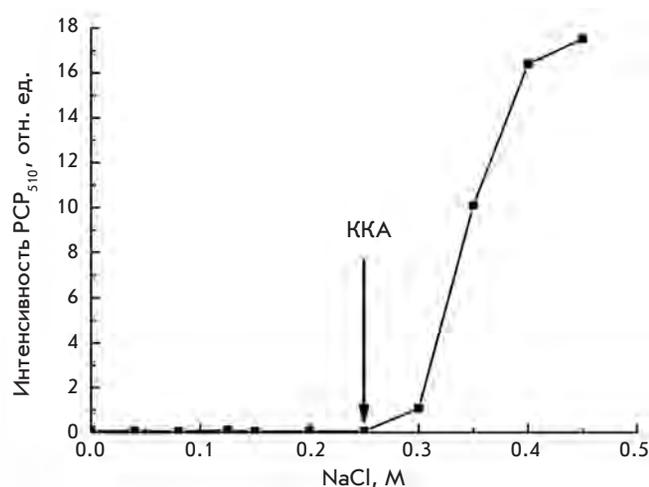


Рис. 2. Зависимость интенсивности РСР при 510 нм в 7.6 мкМ растворе МЦ540 от концентрации NaCl. Стрелкой показана критическая концентрация агрегации (ККА) для NaCl, выше которой начинается формирование агрегатов МЦ540, обнаруживаемых методом РСР.

Кинетический анализ фотоинактивации бактерий *P. aeruginosa* и *S. aureus* в 25 мкМ МЦ540 в дистиллированной воде и в растворе хлорида натрия (0.25 М) был проведен на начальном участке дозовой зависимости, построенной в полулогарифмических координатах. Константа фотоинактивации бактерий найдена по формуле:

$$\beta = \ln(\text{КОЕ}/\text{КОЕ}_0)/F,$$

где КОЕ₀ и КОЕ – способность к колониеобразованию в начальный момент времени и при дозе облучения *F* (кДж/м²) соответственно.

Статистический анализ

Рассчитывали средние значения определяемых величин и стандартную ошибку среднего: $SEM = \pm s/\sqrt{n}$, где *s* – выборочное среднее квадратичное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Спектры поглощения МЦ540

Спектры поглощения МЦ540 в водных и водно-солевых растворах различаются как по амплитуде, так и по форме.

На спектре поглощения МЦ540 в воде видны два максимума (рис. 1, кривая 1): около 500 и 533 нм, которые приписывают димерам и мономерам соответственно, их называют «водные максимумы» [11]. При добавлении 0.25 М хлористого натрия водные

максимумы исчезают и появляется новая полоса поглощения с максимумом около 518 нм и двумя плечами около 570 и 620 нм (рис. 1, кривая 2). Эта новая полоса обусловлена образованием агрегатов [12], что подтверждается появлением полосы РСР [10] (рис. 1, кривая 4).

Спектры РСР, измеренные в тех же условиях, что и спектры поглощения, приведены на рис. 1 (рис. 1, кривые 3 и 4). В отсутствие солей в регистрируемом спектре РСР (рис. 1, кривая 3) видна небольшая полоса около 550 нм, обусловленная флуоресценцией МЦ540 в антистоксовской области (0¹-0-переход). В области поглощения как мономеров, так и димеров МЦ540 резонансное светорассеяние отсутствует. В 0.25 М NaCl возникает полоса РСР, что доказывает факт возникновения агрегатов МЦ540. Форма спектра РСР напоминает спектр поглощения МЦ540 в солевом растворе. Спектр поглощения в водно-солевом растворе имеет интенсивную, симметричную и неструктурированную полосу с максимумом около 518 нм и два менее интенсивных плеча 580 и 620 нм. Спектр РСР похож на спектр поглощения. Наиболее интенсивная полоса светорассеяния перекрывается с интенсивной полосой поглощения, но немного сдвинута в длинноволновую сторону, и в ней просматривается тонкая структура с максимумами около 506 и 528 нм. С длинноволновой стороны от главной полосы РСР, как и в спектре поглощения, наблюдается хвост (рис. 1, кривая 4).

На рис. 2 показана зависимость интенсивности РСР от концентрации NaCl, добавленного в раствор

7.6 мкМ МЦ540. Видно, что при концентрациях соли ниже 0.25 М сигнал РСР отсутствует. При дальнейшем повышении концентрации соли начинается резкий рост интенсивности светорассеяния, свидетельствующий об образовании агрегатов красителя. Концентрацию соли, выше которой наблюдается образование агрегатов, мы назвали критической концентрацией агрегации (ККА). Заметим, что величина ККА остается неизменной при замене NaCl на KCl, т.е. она зависит только от валентности катионов соли. Определение значений ККА проведено нами в интервале концентраций МЦ540 от 5 до 25 мкМ. Зависимость величины ККА от концентрации МЦ540 представлена на рис. 3. Видно, что зависимость ККА от концентрации МЦ540 описывается гиперболой, причем во всем исследованном диапазоне концентраций произведение $[ККА] \times [МЦ540]$ остается постоянной величиной, равной $(1.4 \pm 0.05) \times 10^{-6} \text{ М}^2$. Это произведение является произведением растворимости МЦ540 (подобно произведению растворимости воды). Данные рис. 3 позволяют рассчитать долю неионизированной формы МЦ540, входящей в состав агрегатов. В 25 мкМ растворах МЦ540 в присутствии 0.25 М NaCl эта доля составляет более 3/4 от всех молекул МЦ540.

Фотовыцветание МЦ540

При облучении МЦ540 в воде и в растворе 0.25 М NaCl фотовыцветание происходит неодинаково.

В спектрах поглощения МЦ540 в воде с увеличением дозы облучения видно одинаковое падение оптической плотности (рис. 4А) в обоих «водных максимумах», соответствующих мономерам и димерам МЦ540. Форма спектра в использованном диапазоне доз облучения при этом не меняется.

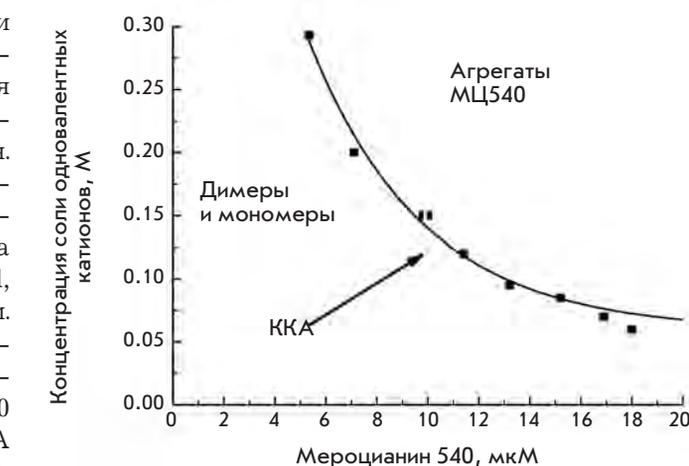
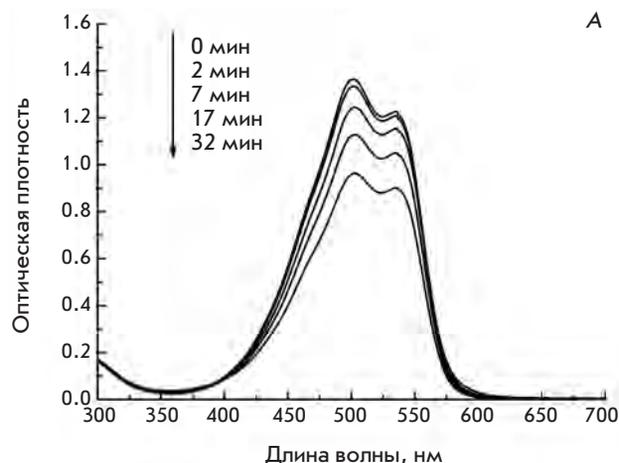


Рис. 3. Зависимость критической концентрации агрегации (ККА) для солей одновалентных катионов от концентрации МЦ540.

В присутствии NaCl фотовыцветание МЦ540 происходило значительно быстрее, чем в воде (рис. 4Б). При этом в ходе облучения наблюдалось также изменение формы спектров поглощения. Примерно с 10 мин облучения становится заметным исчезновение максимума около 518 нм и все отчетливее проявляются «водные максимумы» (вставка на рис. 4Б).

На рис. 5 видно, что начальный участок дозовых кривых фотовыцветания МЦ540 как в воде, так и в 0.25 М растворе NaCl в полулогарифмических координатах отображается прямой линией, т.е. может быть описан моноэкспоненциальной функцией.

Из наклона прямых были рассчитаны (см. «Экспериментальную часть») константы фотовыцветания

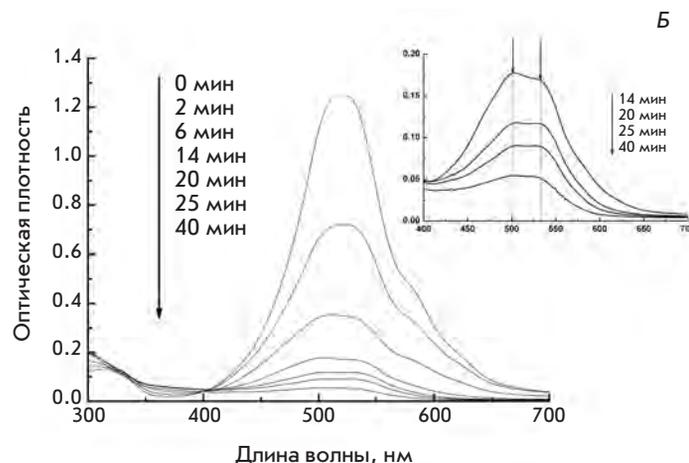


Рис. 4. Фотовыцветание раствора МЦ540 (25 мкМ) в дистиллированной воде (А) и в 0.25 М NaCl (Б).

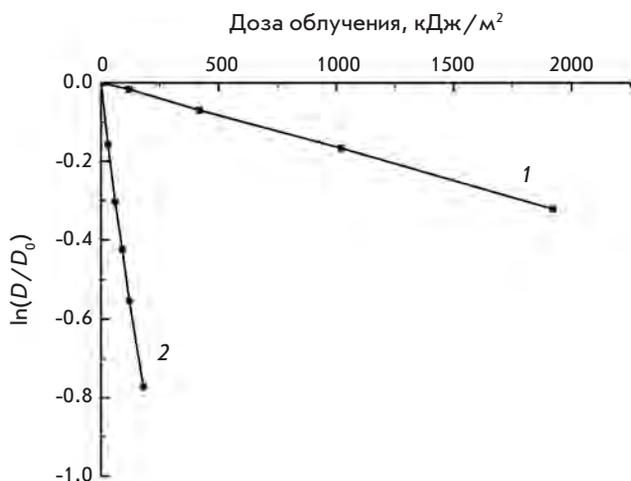


Рис. 5. Дозовые кривые фотовыцветания 25 мкМ МЦ540 в воде (1) и в 0.25 М NaCl (2). D и D_0 – значения оптической плотности в облученном и необлученном растворах соответственно, измеренные при 518 нм.

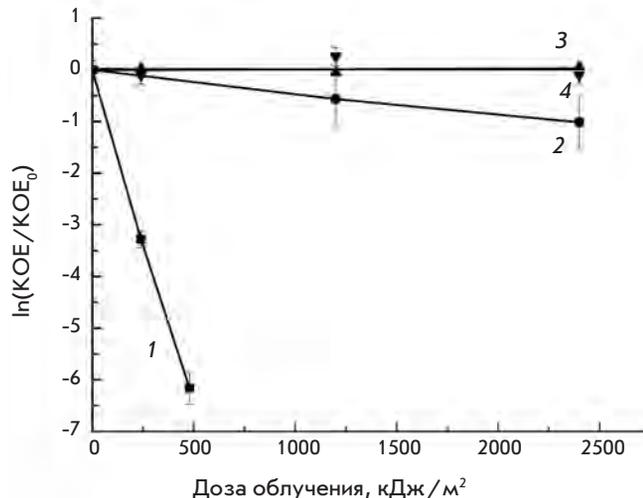


Рис. 6. Дозовые кривые фотосенсибилизированной 25 мкМ МЦ540 инактивации *S. aureus* в дистиллированной воде (2) и в 0.25 М NaCl (1). 3 и 4 – фотоинактивация *S. aureus* в дистиллированной воде и в 0.25 М NaCl без МЦ540 соответственно.

25 мкМ МЦ540 (k), составившие в дистиллированной воде $(70 \pm 3) \times 10^{-6} \text{ м}^2/\text{кДж}$ и $(2080 \pm 80) \times 10^{-6} \text{ м}^2/\text{кДж}$ в 0.25 М растворе хлорида натрия. Видно, что скорость фотовыцветания МЦ540 в присутствии 0.25 М NaCl примерно в 30 раз выше, чем в дистиллированной воде. В солевом растворе МЦ540 находится в основном в агрегированном состоянии, поэтому агрегатам принадлежит главная доля в измеряемой оптической плотности. Соответственно более быстрое фотовыцветание МЦ540 в солевом растворе по сравнению с дистиллированной водой может быть объяснено более высокой фотоллабильностью агрегатов по сравнению с димерами и мономерами МЦ540.

На рис. 6 представлены дозовые кривые фотосенсибилизированной 25 мкМ МЦ540 инактивации *S. aureus* в дистиллированной воде (рис. 6, кривая 2) и в растворе 0.25 М NaCl (рис. 6, кривая 1) в полулогарифмических координатах.

Облучение клеток в отсутствие фотосенсибилизатора не приводило к инактивации ни в дистиллированной воде (рис. 6, кривая 3), ни в 0.25 М NaCl (рис. 6, кривая 4). В предварительных экспериментах было установлено, что инкубация клеток *P. aeruginosa* и *S. aureus* в 25 мкМ растворе МЦ540 без облучения не оказывала на них бактерицидного действия (данные не приведены).

Константы скорости фотосенсибилизированной МЦ540 инактивации бактерий, рассчитанные как описано в «Экспериментальной части», представлены в таблице. Видно, что фотосенсибилизированная 25 мкМ МЦ540 инактивация *S. aureus* в присут-

ствии соли происходила значительно быстрее, чем в дистиллированной воде.

На рис. 7 представлены дозовые кривые фотосенсибилизированной МЦ540 инактивации *P. aeruginosa* в дистиллированной воде (кривая 2) и в 0.25 М NaCl (кривая 1). Облучение в отсутствие МЦ540 не приводило к инактивации ни в дистиллированной воде (кривая 3), ни в растворе 0.25 М NaCl (кривая 4).

При облучении в присутствии МЦ540 на начальных участках дозовых кривых наблюдалось плечо, когда инактивации *P. aeruginosa* не происходило (рис. 7, кривые 1 и 2). Начальный нелинейный участок кривых 1 и 2 (рис. 7) обусловлен, скорее всего, процессами репарации фотоповреждений, которые успевают компенсировать повреждающее действие антимикробной фотодинамической терапии на ранних этапах фотоинактивации. При больших дозах облучения кривые инактивации принимали экспоненциальный характер и спрямлялись в полулогарифмических координатах. Экстраполяция прямолинейных участков до пересечения с горизонталью, соответствующей значению $\ln(\text{KOE}/\text{KOE}_0) = 0$, позволила определить дозы, с которых начинались прямолинейные участки. Эти дозы мы назвали пороговыми ($F_{\text{п}}$). Для водных суспензий $F_{\text{пв}} = 140 \text{ кДж}/\text{м}^2$, для суспензии клеток в солевом растворе $F_{\text{пс}} = 81 \text{ кДж}/\text{м}^2$. В расчет константы фотоинактивации было введено изменение, учитывающее значение пороговой дозы:

$$\beta = \ln(\text{KOE}/\text{KOE}_0) / (F - F_{\text{п}}),$$

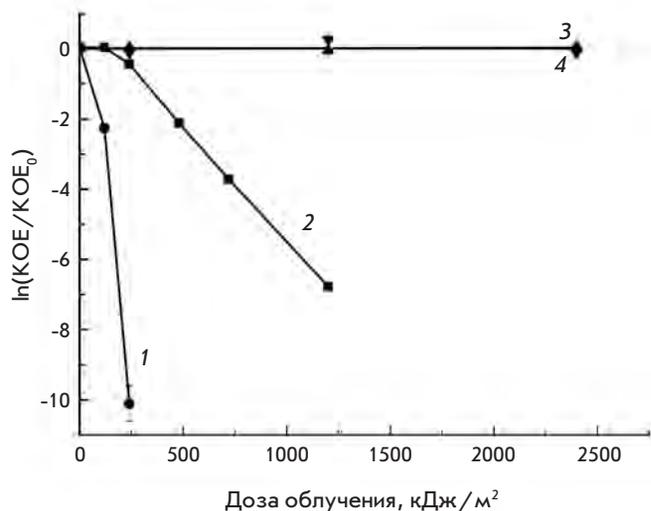


Рис. 7. Дозовые кривые фотосенсибилизированной 25 мкМ МЦ540 инактивации *P. aeruginosa* в дистиллированной воде (2) и в 0.25 М NaCl (1). 3 и 4 – фотоинактивация *P. aeruginosa* в дистиллированной воде и в 0.25 М NaCl без МЦ540 соответственно.

где KOE_0 и KOE – способность к колониеобразованию в начальный момент времени и при дозе облучения $(F - F_n)$ (кДж/м²) соответственно.

Значения констант фотоинактивации приведены в таблице.

Видно, что в присутствии соли фотосенсибилизированная инактивация *P. aeruginosa* происходит примерно в 10 раз эффективнее, чем в дистиллированной воде.

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что агрегатное состояние МЦ540 влияет на тип фотодинамических реакций и образование активных продуктов, которые приводят к повреждению биологических молекул [13], а также на скорость фотовыцветания МЦ540 [7, 8]. Утверждалось, что основным механизмом бактерицидного действия ФС является продукция синглетного кислорода (1O_2) [5, 14]. В то же время показано, что синглетный кис-

лород способен фотогенерировать только мономерные формы МЦ540 [15].

В данной работе нами изучено влияние агрегатного состояния МЦ540 в присутствии 0.25 М хлористого натрия на скорость его фотовыцветания и скорость фотосенсибилизированной 25 мкМ МЦ540 инактивации бактерий. Расчеты, основанные на данных рис. 2 и 3, показывают, что при таких концентрациях NaCl и МЦ540 3/4 молекул красителя находятся в агрегированном состоянии. В ранее опубликованных работах по фотосенсибилизированной МЦ540 инактивации бактерий не пытались воздействовать на агрегатное состояние этого красителя и, тем самым, на эффективность инактивации [2, 3].

МЦ540 – анионный ФС, в дистиллированной воде он существует в виде мономеров и димеров, имеющих максимумы поглощения около 533 и 500 нм соответственно [11]. Поскольку клеточная стенка бактерий несет на себе отрицательный заряд [16–19], равно как момеры и димеры МЦ540, из-за электростатического отталкивания проникновение ФС в клеточную стенку бактерий затрудняется. При этом снижается эффективность фотосенсибилизированной МЦ540 инактивации бактерий. Однако при добавлении соли ее катионы экранируют анионную группу МЦ540, что приводит к снижению электростатического отталкивания между молекулами МЦ540 и образованию крупных агрегатов ФС, обнаруживаемых методом РСР. Кроме того, катионы соли также экранируют отрицательные заряды в клеточной стенке бактерий, что может облегчать взаимодействие ФС с бактериями.

В нашей работе методом РСР было показано, что для каждой концентрации МЦ540 в водном растворе при добавлении солей существует критическая концентрация агрегации (ККА) для соли, выше которой начинается агрегация МЦ540 (рис. 2). Причем произведение ККА на концентрацию МЦ540 в растворах одновалентных катионов является постоянной величиной, равной $[ККА] \times [МЦ540] = (1.4 \pm 0.05) \times 10^{-6} M^2$.

Полученные результаты свидетельствуют, что скорость фотовыцветания 25 мкМ МЦ540 в 0.25 М

Константы фотоинактивации (β , м²/кДж) для *P. aeruginosa* и *S. aureus* в 25 мкМ МЦ540 в дистиллированной воде и в 0.25 М растворе NaCl

<i>P. aeruginosa</i> 104		<i>S. aureus</i> 78	
в воде	в 0.25 М растворе NaCl	в воде	в 0.25 М растворе NaCl
$(6700 \pm 600) \times 10^{-6}$	$(66900 \pm 2500) \times 10^{-6}$	$(500 \pm 60) \times 10^{-6}$	$(13800 \pm 600) \times 10^{-6}$

NaCl примерно в 30 раз выше, чем в дистиллированной воде, и константы скорости фотовыцветания равны $(2080 \pm 80) \times 10^{-6}$ и $(70 \pm 3) \times 10^{-6}$ м²/кДж соответственно. В случае фотосенсибилизированной МЦ540 инактивации *P. aeruginosa* величина константы фотоинактивации в присутствии 0.25 М NaCl возрастала в 10 раз по сравнению с величиной в дистиллированной воде – они были равны $(66900 \pm 2500) \times 10^{-6}$ и $(6700 \pm 600) \times 10^{-6}$ м²/кДж соответственно. Для *S. aureus* константа фотоинактивации в присутствии 0.25 М NaCl примерно в 28 раз $(13800 \pm 600) \times 10^{-6}$ м²/кДж превышала константу скорости инактивации в дистиллированной воде $(500 \pm 60) \times 10^{-6}$ м²/кДж. Мы предполагаем, что подобную разницу в константах скорости фотовыцветания (k) и фотоинактивации (β) можно объяснить влиянием катионов солей как на фотосенсибилизатор, так и на клеточную стенку бактерий.

Только мономеры МЦ540 способны фотогенерировать ¹O₂ [14], а при агрегации их концентрация резко уменьшается, усиление бактерицидного эффекта

в присутствии хлорида натрия не было обусловлено превалирующим действием ¹O₂ на бактерии. Можно предположить, что в агрегатах МЦ540 облегчаются реакции переноса электрона между электронно-возбужденными и невозбужденными молекулами красителя. По-видимому, в присутствии солей в агрегатах МЦ540 активируются фотодинамические реакции, приводящие к генерации свободных радикалов [13], которые могут атаковать бактерии и вызывать их гибель.

ВЫВОДЫ

Полученные данные об усилении бактерицидных эффектов фотосенсибилизатора в присутствии солей могут быть использованы при разработке новых перспективных антибактериальных препаратов, особенно в связи с существующей проблемой множественной антибиотикорезистентности. ●

Работа поддержана Федеральным агентством по науке и инновациям (ГК № 02.740.11.0310).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гейниц А.В., Сорокатый А.Е., Ягудаев Д.М., Трухманов Е.С. // Лазерная медицина. 2007. Т. 11. С. 42–46.
2. O'Brien J.M., Gaffney D.K., Wang T.P., Sieber F. // Blood. 1992. V. 80. P. 277–285.
3. Lin H.Y., Chen C.T., Huang C.T. // Appl. Environ. Microbiol. 2004. V. 70. P. 6453–6458.
4. Sbarra M.S., Di Poto A., Arciola C.R., Saino E., Sharma M., Bragheri F., Cristiani I., Speziale P., Visai L. // Int. J. Artif. Organs. 2008. V. 31. P. 848–857.
5. Pervaiz S. // FASEB J. 2001. V. 15. P. 612–617.
6. Foote C.S. // Photochem. Photobiol. 1991. V. 54. P. 659.
7. Кожина Е.А., Козырь Л.А., Тихомиров А.М., Кягова А.А., Потапенко А.Я. // Вестник РГМУ. 2005. Т. 7. С. 47–52.
8. Кожина Е.А., Тихомиров А.М., Козырь Л.А., Кягова А.А., Потапенко А.Я. // Журн. физ. химии. 2007. Т. 81. С. 1–7.
9. Pasternack R.F., Collings P.J. // Science. 1995. V. 269. P. 935–939.
10. Тихомиров А.М., Шмиголь Т.А., Кожина Е.А., Кягова А.А., Бездетная Л.Н., Потапенко А.Я. // Биофизика. 2009. Т. 54. С. 824–830.
11. Cunderlíková B., Sikurová L., Moan J. // Bioelectrochemistry. 2003. V. 59. P. 1–10.
12. Adenier A., Aaron J. // Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc. 2002. V. 58. P. 543–551.
13. Davila J., Harriman A., Gulliya K.S. // Photochem. Photobiol. 1991. V. 53. P. 1–11.
14. Kalyanaraman B., Feix J.B., Sieber F., Thomas J.P., Girotti A.W. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. P. 2999–3003.
15. Feix J.B., Kalyanaraman B. // Arch. Biochem. Biophys. 1991. V. 291. P. 43–51.
16. Grimmecke H.D., Knirel Y.A., Kiesel B., Voges M., Rietschel E.T. // Carbohydrate Res. 1994. V. 259. P. 45–58.
17. Zähringer U., Lindner B., Rietschel E.T. // Adv. Carbohydrate Chem. Biochem. 1994. V. 50. P. 211–276.
18. Raetz C.R., Ulevitch R.J., Wright S.D., Sibley C.H., Ding A., Nathan C.F. // FASEB J. 1991. V. 5. P. 2652–2660.
19. Navarre W.W., Schneewind O. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1999. V. 63. P. 174–229.

УДК 577.112:577.215

Декомпенсированный метаболический алкалоз у мышей с нокаутом гена *insrr*

И. Е. Деев¹, Д. И. Ржевский², А. А. Берчатова², О. В. Серова¹, Н. В. Попова¹,
А. Н. Мурашев², А. Г. Петренко^{1*}

¹Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

²Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142290, Пушкино Московской обл., ул. Институтская, 6

*E-mail: petrenkoag@gmail.com

Поступила в редакцию 12.05.2011 г.

РЕФЕРАТ Молекулярные механизмы, обеспечивающие поддержание кислотно-щелочного равновесия в организме, до сих пор остаются малоизученными. Развитие алкалоза представляет непосредственную угрозу для жизни человека. Понимание физиологических механизмов компенсации алкалоза будет способствовать появлению новых терапевтических подходов и новых лекарственных средств, эффективных при подобных нарушениях метаболизма. Ранее мы обнаружили, что в слабощелочной среде активируется «сиротский» рецептор, подобный рецептору инсулина (insulin receptor-related receptor, IRR). В представленной работе проведен анализ линии мышей с направленной инактивацией гена *insrr*, кодирующего рецептор IRR, и выявлены их фенотипические отличия, обусловленные нарушением регуляции кислотно-щелочного равновесия. При индукции экспериментального алкалоза в крови мышей с нокаутом рецептора IRR наблюдалось повышение содержания бикарбоната и CO₂.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА алкалоз, IRR.

ВВЕДЕНИЕ

IRR – это рецепторная тирозинкиназа, принадлежащая к мини-семейству инсулинового рецептора, в которое входят рецепторы инсулина и инсулиноподобного фактора роста [1]. кДНК рецептора IRR была клонирована в 1989 году [2], однако до настоящего времени не обнаружено природных агонистов IRR пептидной или белковой природы [3].

В отличие от своих близких гомологов, которые присутствуют в широком спектре тканей и клеток, IRR синтезируется только в определенных тканях и в небольших популяциях клеток. Наибольшее количество IRR выявлено в почках, где он находится лишь в β-вставочных клетках, субпопуляции эпителиальных клеток, выстилающих дистальные каналцы [4]. Эти клетки контактируют с почечным фильтратом, рН которого, в отличие от крови, может существенно изменяться, в том числе и в щелочную сторону. IRR синтезируется также в энтерохромаффиноподобных клетках желудка [5], которые секретируют гистамин, стимулирующий секрецию кислоты, что сопряжено с оттоком щелочи от стенки желудка в кровь. Значительное количество IRR обнаружено в β- и α-клетках островков Лангерганса, которые могут контактировать со щелочным панкреатическим соком [6]. Нами обнаружено, что IRR, в отличие от его

гомологов, способен активироваться при рН > 8.0 [7, 8] и, предположительно, является клеточным сенсором слабощелочной внеклеточной среды. Подобная функция IRR хорошо согласуется с его распределением в тканях и клетках.

С целью выявления функциональных особенностей IRR мы провели фенотипический анализ мышей с нокаутом гена *insrr*, кодирующего этот рецептор. Оказалось, что у таких мышей нарушен компенсаторный ответ на экспериментально индуцированный алкалоз.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Антитела и Вестерн-блот-анализ

Получали антитела кролика против слитого с глутатион-S-трансферазой (GST) фрагмента 539–686 IRR мыши [8]. Антитела очищали на BrCN-сефарозе с пришитым белком, содержащим фрагмент 539–686 IRR мыши и шесть остатков гистидина. Белки подвергали электрофоретическому разделению в 10% полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (SDS), а затем переносили на нитроцеллюлозную мембрану. С целью уменьшения неспецифической сорбции мембрану инкубировали в буфере milk/TBS-T (5% обезжирен-

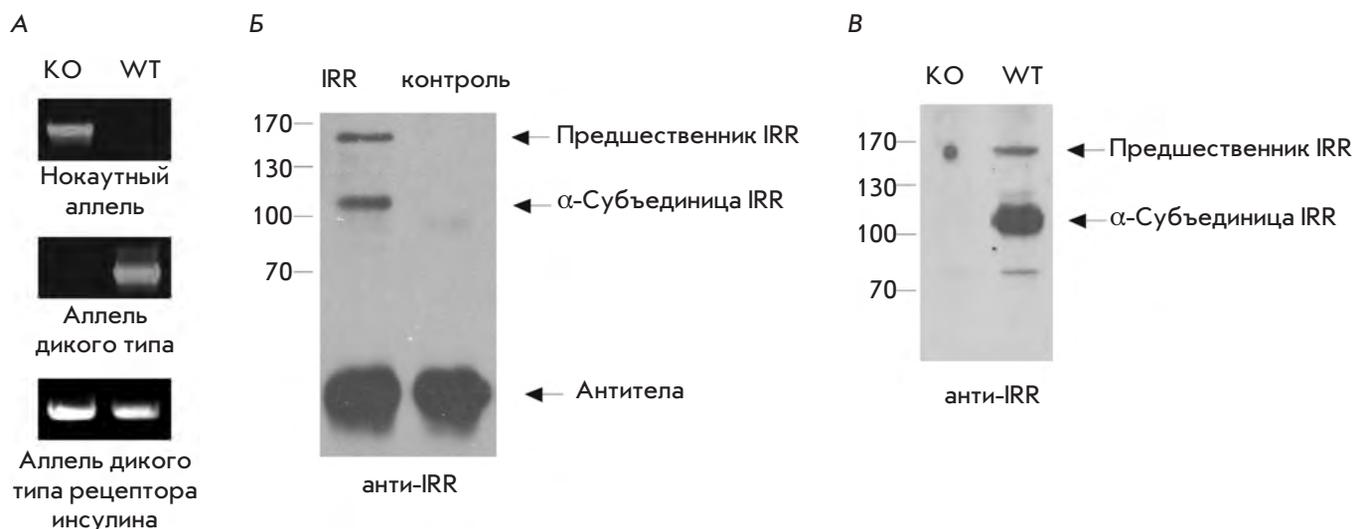


Рис. 1. Анализ инактивации гена *insrr* у мышей. А – ПЦР на геномной ДНК мышей дикого типа и с нокаутом гена *insrr* с использованием праймеров к дикому аллелю IRR, IR и инактивированному аллелю IRR. Б – Вестерн-блоттинг с использованием антител против участка в эктодомене IRR. На дорожки нанесены белки, осажденные из лизатов клеток HEK293, трансфицированных вектором, обеспечивающим экспрессию рецептора IRR, и нетрансфицированных клеток (контроль), антителами против эпитопа HA. В – Вестерн-блоттинг с использованием антител против участка в эктодомене IRR на WGA-элюатах (*wheat germ agglutinin*, агглютинин зародышей пшеницы) из мембран почки мышей дикого типа и с нокаутом гена *insrr*. На каждую дорожку нанесено по 10 мкг белка элюатов.

ного молока, 20 мМ Трис-НСl, рН 7.6, 140 мМ NaCl, 0.1% Твин-20) в течение ночи при 4°C. Для детекции белков мембрану инкубировали с первичными антителами (1 : 5000 по объему) в течение 60 мин при комнатной температуре, промывали ТBS-Т и инкубировали с вторичными антителами к иммуноглобулинам кролика, конъюгированными с пероксидазой хрена (1 : 10000 по объему) в течение 1 ч. Связавшиеся антитела выявляли с использованием системы хемилюминесценции SuperSignal West Pico [9].

Эксперименты с животными

Мыши с нокаутом IRR получены оплодотворением *in vitro* замороженной спермой мышью с нокаутом всех генов семейства рецептора инсулина, т.е. с тройным нокаутом [10]. Опыты проводили на половозрелых бодрствующих самцах мышей с направленной инактивацией только гена *insrr*. Генотипирование проводили согласно [10]. Контролем служили мыши линии C57BL6. Животных содержали в Питомнике лабораторных животных ФИБХ (г. Пущино) в стандартных условиях (температура 21 ± 2°C, влажность 30–70%, цикл освещения – 12/12 ч), корм и воду мыши получали *ad libitum*.

Опыты проводили на бодрствующих животных. Мышам в хвостовую вену вводили 1.3% раствор NaHCO₃ (200 мкл/10 г веса тела) в течение 5 с. Об-

разцы крови анализировали за 30 мин до введения NaHCO₃ (точка 0) и через 5 и 15 мин после инъекции. Кровь собирали через ретроорбитальный синус пластиковыми капиллярами (Lithim-Heparin, 50 ед./мл) и анализировали на газоанализаторе электролитов крови (Bloodgas analyzer Rapidpoint 405, «Siemens»). Все манипуляции выполняли в соответствии с протоколом, утвержденным институтской комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для получения гомозиготной линии мышей с нокаутом IRR мы скрестили животных с нокаутом гена *insrr*, а также генов рецепторов инсулина и инсулиноподобного фактора роста (тройной гетерозиготный нокаут [10]) с мышами дикого типа той же линии (C57BL6). Присутствие аллелей с нокаутом гена *insrr* и отсутствие аллелей с нокаутом генов рецепторов инсулина и инсулиноподобного фактора роста проверяли с помощью ПЦР на геномной ДНК мышей (*рис. 1А*).

Синтез белка IRR у мышей с нокаутом гена *insrr* мы анализировали с помощью полученных нами антител, которые специфично распознают участок в эктодомене рецептора IRR (*рис. 1Б*). Окрашивание этими антителами вестерн-блотов частично очищенных

Параметры крови мышей дикого (WT) типа и с нокаутом гена *insrr* (КО)

Электролиты крови	Мыши WT		Мыши КО	
	Среднее значение	Погрешность	Среднее значение	Погрешность
pH	7.21	0.03	7.29	0.02
PCO ₂ , мм рт.ст.	50	1.5	49	1.5
PO ₂ , мм рт.ст.	41	0.8	42	0.8
BE, ммоль/л	-8.4	1.8	-4.2	1.2
TCO ₂ , ммоль/л	21.4	1.6	24.4	1.0
HCO ₃ , ммоль/л	19.9	1.6	22.9	1.0
Na, ммоль/л	148	0.9	148	0.8
K, ммоль/л	6.2	0.1	6.3	0.2
Ca, ммоль/л	1.25	0.0	1.24	0.0
tHb, г/л	16.8	0.3	18.0	0.4
Hct, %	50	1.0	54	1.1

Примечание. В каждой группе было по восемь мышей. Указаны: pH крови, PCO₂ – содержание углекислого газа, PO₂ – содержание кислорода, BE – отклонение концентрации буферных оснований от нормального уровня, TCO₂ – общее содержание углекислого газа, HCO₃ – содержание бикарбоната, Na – содержание натрия, K – содержание калия, Ca – содержание кальция, tHb – содержание гемоглобина, Hct – гематокритное число.

экстрактов мембран почек нормальных мышей и мышей с нокаутом гена *insrr* доказало, что у полученных нами мышей отсутствует белок IRR (*рис. 1B*).

Первичный анализ, выполненный в обычных условиях, не выявил существенных отличий мышей с нокаутом гена *insrr* от нормальных мышей той же линии [11], поэтому мы провели две серии опытов на мышцах дикого типа и на мышцах с инактивированным геном *insrr* – в нормальных условиях и при индуцированном алкалозе.

В первой серии опытов мы определили 11 параметров крови у находившихся в обычных условиях мышей из обеих групп (по восемь животных в группе). Оказалось, что у мышей с нокаутом гена *insrr* содержание бикарбоната в крови (22.9 ± 1.0 против 19.9 ± 1.6 , $p < 0.05$), а также pH (7.29 ± 0.02 против 7.21 ± 0.03 , $p < 0.05$) и гематокрит (54 ± 1.1 против 50 ± 1.0 , $p < 0.05$) были выше, чем у животных дикого типа. Остальные параметры крови практически не отличались (*таблица*).

Во второй серии опытов отобрали две группы животных – 10 мышей дикого типа или 12 особей нокаутного типа. Метаболический алкалоз индуцировали внутривенным введением 1.3% раствора NaHCO₃ (200 мкл/10 г веса мыши). Параметры крови определяли в начале опыта, через 5 и 15 мин после щелочной нагрузки. Через 5 мин после инъекции щелочного раствора динамика изменения концентрации бикарбоната и pH крови у мышей с нокаутом IRR была такой же, как и у мышей дикого типа, т.е. наблюдалось повышение pH (от 7.24 ± 0.03 до 7.34 ± 0.02 , $p < 0.05$ у мышей дикого

типа и от 7.33 ± 0.01 до 7.36 ± 0.02 , $p < 0.2$ при нокауте IRR), а также содержание бикарбоната (от 19.25 ± 0.98 до 23.47 ± 1.06 , $p < 0.05$ у мышей дикого типа и от 23.64 ± 0.63 до 26.43 ± 0.53 , $p < 0.05$ при нокауте) (*рис. 2A,B*). У мышей обеих групп через 15 мин после индукции алкалоза pH крови стал несколько ниже, чем через 5 мин (7.33 ± 0.03 у мышей дикого типа и 7.35 ± 0.02 при нокауте). Однако у мышей с нокаутом IRR через 15 мин отмечено существенное повышение содержания бикарбоната и концентрации CO₂ в крови по сравнению с мышцами дикого типа (*рис. 2B,B*). Таким образом, животные дикого типа и с нокаутом гена *insrr* по-разному реагировали на острый экспериментальный алкалоз, вызванный введением бикарбоната в кровь.

ВЫВОДЫ

Ранее мы показали, что IRR является сенсором внеклеточной щелочной среды, а его отсутствие в организме приводит к нарушению компенсации метаболического алкалоза, вызванного многодневным кормлением животных щелочной пищей. Этот эффект имел в своей основе нарушение секреции бикарбоната почками у мышей с нокаутом IRR [8]. Результаты изучения компенсации индуцированного алкалоза в острых (5–15 мин) условиях подтверждают нашу гипотезу о компенсаторной роли IRR в секреции бикарбоната. Мы можем заключить, что IRR-зависимая компенсация алкалоза происходит достаточно быстро. Интересно, что у мышей с нокаутом IRR также наблюдается компенсация алкалоза, судя по снижению pH крови, однако это про-

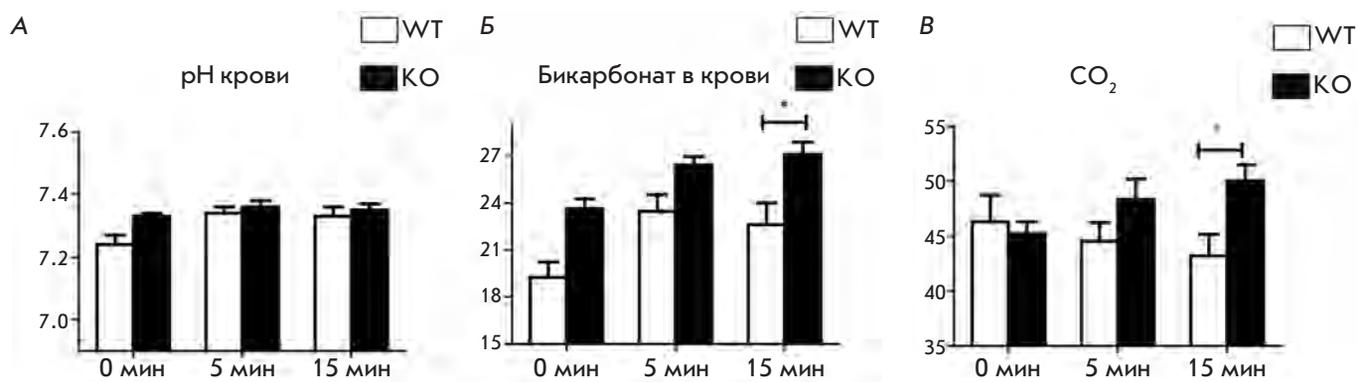


Рис. 2. Параметры крови мышей дикого типа (WT) и с нокаутом гена *insrr* (KO) до и после инъекции бикарбоната. А – pH крови. Б – Концентрация бикарбоната (ммоль/л). В – Содержание CO₂ в крови (мм рт.ст.). **p* < 0.05 по критерию Стьюдента.

исходит не вследствие секреции избыточного бикарбоната, а в результате повышения концентрации CO₂ в крови, что, по-видимому, вызвано замедлением дыхания или ускорением метаболизма. Таким образом, мы можем заключить, что IRR является существенной частью одного из физиологических механизмов регуляции кислотно-щелочного равновесия, а линия мышей с нокаутом IRR может найти применение в качестве животной модели патологического развития метаболического алкалоза. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты № 06-04-49706а, 09-04-01644-а, 10-04-01794-а и 09-04-12201-офи м), Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» и Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Marino-Buslje C., Martin-Martinez M., Mizuguchi K., Siddle K., Blundell T.L. // *Biochem. Soc. Trans.* 1999. V. 27. P. 715–726.
2. Shier P., Watt V.M. // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. P. 14605–14608.
3. Dissen G.A., Garcia-Rudaz C., Tapia V., Parada L.F., Hsu S.Y., Ojeda S.R. // *Endocrinology.* 2005. V. 147. № 1. P. 155–165.
4. Bates C.M., Merenmies J.M., Kelly-Spratt K.S., Parada L.F. // *Kidney Int.* 1997. V. 52. P. 674–681.
5. Tsujimoto K., Tsuji N., Ozaki K., Ohta M., Itoh N. // *Endocrinology.* 1995. V. 136. P. 558–561.
6. Hirayama I., Tamemoto H., Yokota H., Kubo S.K., Wang J., Kuwano H., Nagamachi Y., Takeuchi T., Izumi T. // *Diabetes.* 1999. V. 48. P. 1237–1244.
7. Deev I.E., Vasilenko K.P., Kurmangaliev E., Serova O.V., Popova N.V., Galagan Y.S., Burova E.B., Zozulya S.A., Nikol'skii N.N., Petrenko A.G. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2006. V. 408. P. 184–187.
8. Deyev I.E., Sohet F., Vassilenko K.P., Serova O.V., Popova N.V., Zozulya S.A., Burova E.B., Houillier P., Rzhnevsky D.I., Berchatova A.A., et al. // *Cell Metab.* 2011. V. 13. P. 679–689.
9. Deyev I.E., Petrenko A.G. // *Biochimie.* 2010. V. 92. P. 418–422.
10. Nef S., Verma-Kurvari S., Merenmies J., Vassalli J.D., Efstratiadis A., Accili D., Parada L.F. // *Nature.* 2003. V. 426. P. 291–295.
11. Kitamura T., Kido Y., Nef S., Merenmies J., Parada L.F., Accili D. // *Mol. Cell Biol.* 2001. V. 21. P. 5624–5630.

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.

После принятия статьи к публикации редакция заключает с авторами лицензионный договор о передаче права на использование произведения.

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» набиваются следующим образом: 02.05.1991.
- Точка не ставится после: УДК, заглавия статьи, авторов, адресов, заголовков и подзаголовков, названий таблиц, размерностей (с – секунда, г – грамм, мин – минута, ч – час, сут – сутки, град – градус).
- Точка ставится после: сноска (в том числе в таблицах), примечаний к таблице, подписей к рисункам, краткой аннотации, сокращений (мес. – месяц, г. – год, т. пл. – температура плавления), но не ставится в подстрочных индексах: $T_{пл}$ – температура плавления, $T_{ф.п}$ – температура фазового перехода. Исключение: млн – миллион – без точки.
- Десятичные цифры набираются только через точку, а не через запятую (0.25 вместо 0,25).
- Сокращения единиц измерений пишутся только русскими буквами (мкМ, но не μ М; нм, но не nm).
- Знак «–» (тире) отбивается пробелами, знаки «минус», «интервал» или «химическая связь» пробелами не отбиваются.

- В качестве знака умножения используется только «×». Знак «×» ставится только в том случае, если справа от него стоит число. Символом «•» обозначаются комплексные соединения в химических формулах, а также нековалентные комплексы (ДНК:РНК и т.п.).
- Используются только «кавычки».
- 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, Pe, Val и т.д.) и фосфатов (АТР, 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 специалистам в данной области исследований, и по результатам рецензирования редколлегия определяет дальнейшую судьбу рукописи: принятие к публикации в представленном виде, необходимость доработки или отклонение.

Рукопись, направленная авторам на доработку по замечаниям рецензентов и редакторов, рецензируется повторно,

после чего редколлегия вновь решает вопрос о приемлемости ее для публикации. В начале публикуемой статьи приводятся даты поступления рукописи в редакцию и принятия рукописи в печать после положительного решения рецензента.

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

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

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

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

ОФОРМЛЕНИЕ ССЫЛОК

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Для связи с редакцией следует использовать следующие электронные адреса: vera.knorre@gmail.com, actanaturae@gmail.com, телефоны: (495) 727-38-60, (495) 930-80-05.