

Письмо редакторов

Дорогие читатели «Acta Naturae»! У нас своего рода юбилей. Вашему вниманию предлагается десятый номер журнала. Выражаем надежду, что он вас не разочарует. Номер начинается обзорной статьей группы сотрудников МГУ им. М.В. Ломоносова, работающих под руководством М.Б. Готтих. В статье рассматриваются перспективы разработки лекарственных соединений, имеющих специфическую ингибирующую активность ВИЧ-интегразы. Стадия интегрирования вирусной ДНК в клеточную ДНК катализируется вирусной интегразой. Блокирование активности этого фермента приведет к остановке вирусной репликации и будет иметь весьма благоприятные перспективы для терапевтического применения. Ингибиторы интегразы пока не входят в качестве компонентов классического «коктейля», состоящего из ингибиторов обратной транскриптазы и протеазы. Вместе с тем проблемы устойчивости мутантных форм требуют пристального внимания к новым ферментативным мишеням. Имеющиеся данные обнадеживают. Альтернативным химическому подходу, изложенному выше, эффективным способом «выключения» регуляторных путей является технология siРНК. Исследователи из Новосибирского Академгородка под руководством профессора М.А. Зенковой применили его на клеточных линиях с целью снижения скорости пролиферации. Данная фундаментальная работа будет иметь выраженные клинические перспективы. Работа группы авторов из МГУ под руководством академика И.Г. Атабекова представила работу по сборке *in vitro* комплексов белков Х-вируса картофеля. Предложенный способ продемонстрировал принципиальную возможность упаковки чужеродного генетического материала в вирусоподобные частицы. Две работы группы авторов из Медуниверситета им. Н.И. Пирогова, Москва (профессор О.А. Фаворова) и Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, USA (professor J.R. Testa и professor E.P. Henske) носят пионерский характер. Они описывают транскрипционный фактор DLX5 как новую мишень для противораковой терапии. В следующей работе рассмотрена роль белка рабин-8 в функционировании протеинкиназного комплекса mTORC1 и связанный с этим процесс биосинтеза белка. Обе статьи имеют четко выраженную потенциальную клиническую на-

правленность. Статья из Академических центров Уфы, Новосибирска и Якутска, выполненная под руководством профессора Э.К. Хуснутдиновой, имеет своей целью провести популяционный анализ с использованием мутаций гена *GJB2-35delG*, связанного с наследственной тугоухостью. Авторы делают весьма интересный вывод о временных рамках миграции населения. Традиционно несколько работ посвящено различным аспектам биотехнологии. Так, авторский коллектив под руководством академика РАМН А.Л. Гинцбурга предложил работу по экспрессии нанокристаллов с использованием аденовирусного вектора. Статья коллектива авторов под руководством академика М.П. Кирпичникова посвящена важнейшей проблеме – экспрессии мембранных белков. Работа, выполненная под руководством академика РАМН А.М. Егорова, посвящена технологии экспрессии в дрожжевой системе детекционного рекомбинантного конъюгата антитело–пероксидаза. Журнал не прошел мимо еще одной актуальной как в фундаментальном, так и в практическом смысле проблемы – направленной доставки генов. Данное направление необходимо для поступательного характера движения в области генотерапии. В работе коллектива из Института эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи рассмотрен эффективный способ доставки гена интерлейкина-2 в гемопоэтические клетки. Работа коллектива авторов из МГУ и Института молекулярной генетики РАН посвящена исследованию структурных особенностей морфологии цитоскелета методом атомно-силовой микроскопии. Мы и в дальнейшем планируем публиковать работы, связанные с новыми способами визуализации биологических объектов.

Статья доктора химических наук П.В. Сергиева, опубликованная в разделе «Форум», посвящена роли высокопродуктивного секвенирования для анализа геномов. Мы ждем откликов на эту публикацию. В дальнейшем мы будем уделять самое пристальное внимание вопросам развития новых аналитических технологий в России. В настоящее время приборная база многих учреждений в РФ вызывает восхищение. Можно лишь выразить надежду, что отечественные исследователи смогут в ближайшее время добиться прорывных результатов. ●

Наука и технологии России – STRF.ru



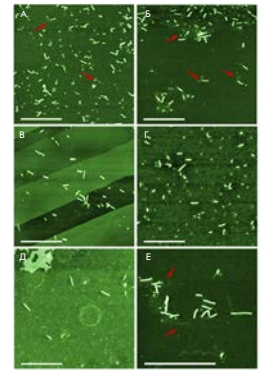
- 40% учёных согласны с тем, что публикации о результатах научной работы способствуют просвещению общества, росту престижа профессии учёного, улучшению имиджа науки
- 34% считают, что, распространяя информацию о результатах своей работы, они смогут привлечь клиентов, партнёров, деньги
- 12% надеются,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

М. В. Архипенко, Е. К. Петрова, Н. А. Никитин, А. Д. Протопопова, Е. В. Дубровин, И. В. Яминский, Н. П. Родионова, О. В. Карпова, И. Г. Атабеков

Искусственные вирусоподобные частицы, полученные *in vitro* из белка оболочки X-вируса картофеля и чужеродных вирусных РНК

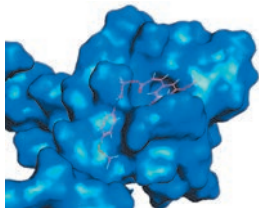
X-вирус картофеля (ХВК) и ряд других потексвирусов способны к реконструкции *in vitro* из вирусного белка оболочки и РНК. Показано, что при инкубации с белком оболочки ХВК различных чужеродных (гетерологичных) РНК образуются вирусные рибонуклеопротеиды (вРНП), морфологически и по трансляционным свойствам подобные гомологичным вРНП. По-видимому, образование *in vitro* гетерологичных вРНП с участием белка оболочки ХВК не зависит от специфической нуклеотидной последовательности 5'-конца РНК, и белок оболочки ХВК способен упаковать чужеродный генетический материал различного размера и состава в вирусоподобные искусственные частицы.



АСМ-изображения вРНП, собранных *in vitro* при инкубации белка оболочки X-вируса картофеля с гомологичной и гетерологичными РНК.

Р. А. Тимахов, П. О. Федичев, А. А. Винник, J. R. Testa, О. О. Фаворова

Транскрипционный фактор DLX5 как новая мишень для перспективных противоопухолевых препаратов



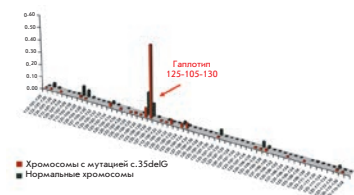
Расположение в активном сайте транскрипционного фактора DLX5.

На основании анализа кристаллической структуры транскрипционного фактора DLX5 человека из библиотеки, содержащей 10^6 химических соединений, методом молекулярного докинга выбраны малые молекулы – потенциальные лиганды DLX5. Показано, что наилучшей способностью ингибировать пролиферацию лимфоцитов мыши, экспрессирующих *Dlx5*, обладает соединение Q12, действие которого сопровождается снижением экспрессии протоонкогена *c-myc*. Это соединение может использоваться для дальнейшей химической оптимизации и разработки высокоэффективных противоопухолевых препаратов.

Л. У. Джемилева, О. Л. Посух, Н. А. Барашков, С. А. Федорова, Ф. М. Терютин, В. Л. Ахметова, И. М. Хидиятова, Р. И. Хусаинова, С. Л. Лобов, Э. К. Хуснутдинова

Оценка гаплотипического разнообразия и реконструкция предкового гаплотипа, ассоциированного с мутацией с.35delG гена *GJB2* (Cx26), в популяциях Волго-Уральского региона

Наибольший вклад в генетически обусловленную потерю слуха вносят мутации гена *GJB2* (Cx26). Спектр и распространенность отдельных мутаций гена *GJB2* специфичны для популяций разной этнической принадлежности. Показано происхождение ряда мутаций гена *GJB2* от предковой хромосомы-основателя, ориентировочно оценен их «возраст» и очерчены предположительные регионы их возникновения. Гаплотипический анализ хромосом с мутацией с.35delG, выявленной у больных с наследственной несиндромной нейросенсорной тугоухостью/глухотой и в популяционных выборках, позволил реконструировать предковый гаплотип с этой мутацией, установить единство происхождения большинства исследованных мутантных хромосом и датировать время экспансии (11800 лет) носителей мутации с.35delG на территории Волго-Уральского региона.



Распределение частот гаплотипов D13S141–D13S175–D13S143 на нормальных хромосомах и хромосомах с мутацией с.35delG у больных с НСНТ.

Acta Naturae

ТОМ 3, № 3 (10), ИЮЛЬ—СЕНТЯБРЬ 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. Габибов, С.Н. Кочетков

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

Редакционная коллегия:

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

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

Корректурa: 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 28 сентября 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

П. В. Сергиев

Применение высокопроизводительных методов в постгеномных исследованиях. . . . 6

ОБЗОРЫ

С. П. Королев, Ю. Ю. Агапкина, М. Б. Готтих

Проблемы и перспективы клинического применения ингибиторов интеграции ВИЧ-1 13

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

И. А. Акимов, Е. Л. Черноловская, Ю. Е. Спицына,
Е. И. Рябчикова, М. А. Зенкова

Подавление экспрессии генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC* с помощью siРНК снижает скорость пролиферации клеток нейробластомы человека на длительное время. 31

М. В. Архипенко, Е. К. Петрова, Н. А. Никитин,
А. Д. Протопопова, Е. В. Дубровин, И. В. Яминский,
Н. П. Родионова, О. В. Карпова, И. Г. Атабеков

Искусственные вирусоподобные частицы, полученные *in vitro* из белка оболочки X-вируса картофеля и чужеродных вирусных РНК 42

СОДЕРЖАНИЕ

Р. А. Тимахов, П. О. Федичев, А. А. Винник,
J. R. Testa, О. О. Фаворова
**Транскрипционный фактор DLX5
как новая мишень для перспективных
противоопухолевых препаратов 49**

Л. У. Джемилева, О. Л. Посух, Н. А. Барашков,
С. А. Федорова, Ф. М. Терютин, В. Л. Ахметова,
И. М. Хидиятова, Р. И. Хусаинова, С. Л. Лобов,
Э. К. Хуснутдинова
**Оценка гаплотипического разнообразия
и реконструкция предкового гаплотипа,
ассоциированного с мутацией с.35delG
гена *GJB2* (*Cx26*), в популяциях
Волго-Уральского региона 54**

И. Ю. Грибова, С. В. Тиллиб, И. Л. Тутьихина,
М. М. Шмаров, Д. Ю. Логунов, Л. В. Верховская,
Б. С. Народицкий, А. Л. Гинцбург
**Эффективная экспрессия нанокристаллов
рекомбинантным аденовирусным
вектором *in vitro*. 66**

А. А. Пархитко, О. О. Фаворова, Е. Р. Henske
**Белок рабин-8 взаимодействует
с GTP-азой Rheb и ингибирует
фосфорилирование Ser235/Ser236 в белке
S6 малой рибосомной субъединицы. 73**

С. А. Гончарук, М. В. Гончарук, М. Л. Майзель,
Д. М. Лесовой, В. В. Чупин, Э. В. Бочаров,
А. С. Арсеньев, М. П. Кирпичников
**Бактериальный синтез и очистка
трансмембранного сегмента нормальной
и мутантной рецепторной тирозинкиназы
FGFR3 человека. 80**

О. В. Колясников, В. Г. Григоренко,
А. М. Егоров, S. Lange, R. D. Schmid
**Получение рекомбинантного конъюгата
пероксидазы хрена с Fab-фрагментом
антител с использованием экспрессионной
системы *Pichia pastoris* 88**

Ю. М. Ефремов, Е. В. Дзюбенко, Д. В. Багров,
Г. В. Максимов, С. И. Шрам, К. В. Шайтан
**Исследование распределения
и механических свойств цитоскелета
астроцитов в среде культивирования
методом атомно-силовой микроскопии . . . 96**

В. Н. Рогожин, Д. Ю. Логунов, Д. В. Щепляков,
М. М. Шмаров, Е. Е. Ходунова, И. В. Гальцева,
Р. В. Белоусова, Б. С. Народицкий, А. Л. Гинцбург
**Эффективный способ доставки гена
интерлейкина-2 в гемопоэтические
клетки человека с использованием
рекомбинантного аденовируса
с модифицированным фибром 103**

Правила для авторов 111

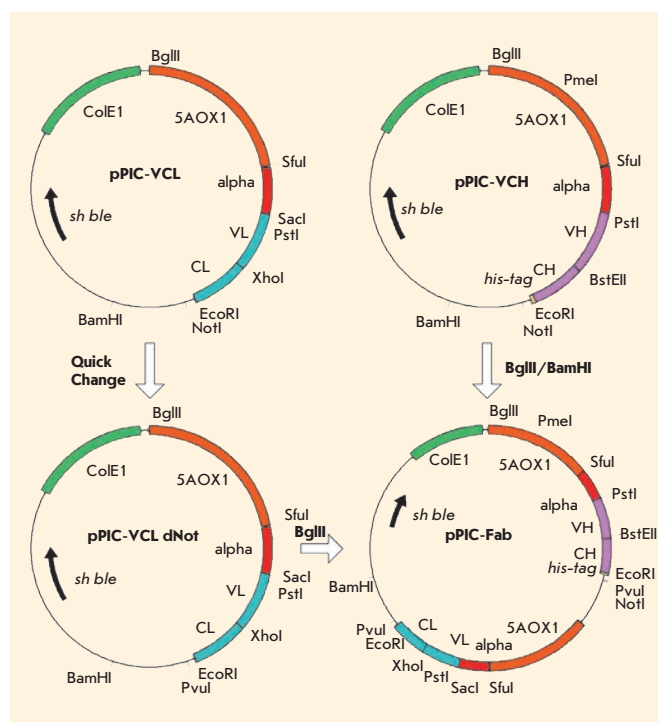


РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ
Схема получения плазмиды pPIC-Fab.
(См. статью Колясникова и др.)

Применение высокопроизводительных методов в постгеномных исследованиях

П. В. Сергиев

Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского и химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119992, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40
E-mail: petya@genebee.msu.ru

С развитием высокопроизводительных методов секвенирования геномов происходит лавинообразное накопление информации о нуклеотидных последовательностях генов. Наше понимание функциональной роли генов, механизмов их экспрессии и взаимовлияния все более отстает. Задачей постгеномных исследований видится массовое высокопроизводительное изучение экспрессии, взаимодействий и функциональной роли генов. С этой целью активно разрабатываются и уже используются на практике подходы, составляющие основу инструментария постгеномной биологии.

В геномах живых существ закодирована информация об их строении и функционировании, а также о том, как эти организмы должны реагировать на внешние условия. Сейчас важнейший шаг в изучении любого вида состоит в определении последовательности его генома. Размеры геномов разнятся в пределах от нескольких сот тысяч нуклеотидов у некоторых бактерий до сотен миллиардов у некоторых эукариот. Число генов возрастает вместе с размером генома, но лишь до определенного уровня. К настоящему времени разработаны несколько высокопроизводительных методов определения нуклеотидной последовательности геномов. Это платформы Roche/GS-FLX Titanium (500 миллионов нуклеотидов в день), Illumina/HiSeq 2000 (55 миллиардов нуклеотидов в день) и ABI/SOLiD 5500xl (до 30 миллиардов нуклеотидов в день).

В 2011 г. продолжается взрывной рост информации о нуклеотидных последовательностях. В основной базе данных Генбанк (GenBank) к началу 2011 г. уже содержалось 126 551 501 141 основание. Удешевление процедуры секвенирования продолжается и должно привести в обозримом будущем к определению метагенома всей биосферы.

С развитием высокопроизводительных методов секвенирования получение новой информации о нуклеотидных последовательностях стало заметно опережать наше понимание функции как отдельных генов, так и всей их совокупности. В 2000 г. Пеер Борк сформулировал проблему: в каждом новом геноме примерно 30% генов осуществляют неизвестную нам пока функцию. Более того, достоверность предсказания функции оставшихся 70% генов тоже составляет около 70%, т.е.

мы находимся примерно в том состоянии, что и географы в эпоху Великих географических открытий – общие очертания уже понятны, но очень много еще предстоит сделать, чтобы понять полную картину мира. Изучая живой организм, мы должны определить тип и степень взаимовлияния всех генов, продукты которых оказывают влияние друг на друга.

Изучить ген, значит ответить на несколько вопросов (рис. 1). Во-первых, нужно узнать, что будет с клеткой или организмом, если ген инактивировать или временно «выключить». С этим связан также вопрос о том, могут ли мутации в областях генома, удаленных от данного гена, уменьшить или увеличить последствия инактивации этого гена. Все гены работают в разных условиях. Некоторые нужны всегда, некоторые только при определенных обстоятельствах. Очень многое в понимании того, зачем нужен ген, дает изучение условий, в которых он работает, т.е. когда возникает необходимость в продукте этого гена. Поскольку работа гена осуществляется в несколько этапов, мы должны изучить все эти этапы. Во-вторых, необходимо узнать, когда ген транскрибируется. В-третьих, когда он транслируется. В-четвертых, с какими молекулами (белками, РНК, ДНК, малыми молекулами) он взаимодействует. Если ген кодирует фермент, то какие реакции

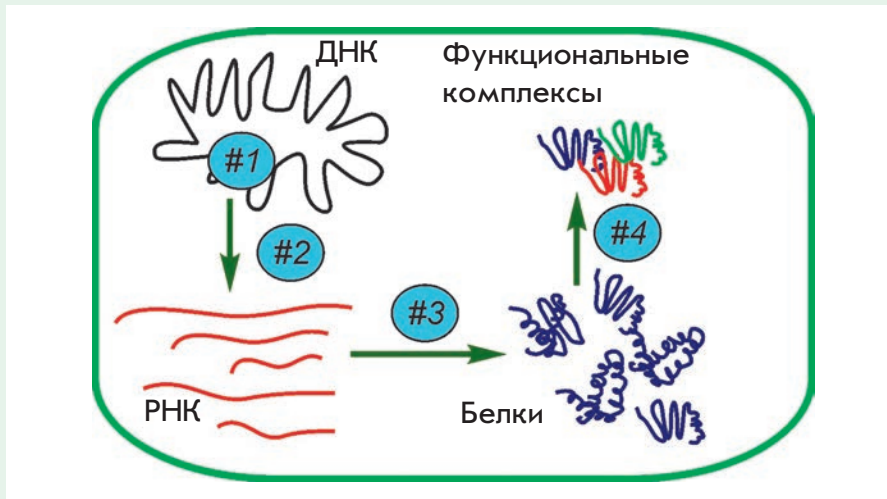


Рис. 1. Схема функционирования гена и вопросы, на которые необходимо ответить при изучении гена. Схематично показаны и подписаны ДНК, РНК, белки и функциональные комплексы. Стрелками показаны пути экспрессии гена и функционирования продукта гена. В синих кружках обозначены вопросы, на которые нужно ответить: (#1) Каков фенотип нокаута гена? (#2) Как ген транскрибируется? (#3) Как мРНК, соответствующая гену, транслируется? (#4) С какими компонентами клетки взаимодействует продукт гена?

он катализирует. Если не фермент, то в каких процессах он участвует.

Развитие постгеномных технологий не может быть эффективным без методической базы, позволяющей изучать функциональные взаимодействия множества генов и их продуктов. При этом необходимо развитие методов, позволяющих изучать как экспрессию всех генов при определенных условиях, так и методов, основанных на генетических манипуляциях с каждым геном из полного набора генов организма.

МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ НА СТАДИИ ТРАНСКРИПЦИИ

Как следует из предложенной Фрэнсисом Криком центральной догмы молекулярной биологии, экспрессия генов происходит в два этапа. Сначала ген транскрибируется при помощи РНК-полимеразы, в результате

чего появляется соответствующая РНК. Иногда именно РНК является функциональным продуктом гена, и тогда экспрессия гена тождественна транскрипции и созреванию РНК. Чаще РНК-копия гена представляет собой мРНК и транслируется с помощью рибосом, в результате чего образуется белковый продукт. Для того чтобы «измерить» экспрессию гена используются методы, определяющие количество РНК или белка. При постгеномных исследованиях необходимо измерять количественные характеристики экспрессии множества, а в идеальном случае – всех генов организма.

В настоящее время стандартным методом измерения количества всех разновидностей РНК в клетках служит гибридизация на микрочипах (рис. 2А). Для определения уровня экспрессии гена с использованием микрочипов из клеток выделяют

суммарную РНК и с помощью обратной транскрипции создают кДНК. Эта кДНК модифицируется флуоресцентными красителями. Обычно сравнивают два образца кДНК, окрашенных красителями Су3 и Су5. Смесь кДНК, окрашенных разными красителями, гибридизуют на микрочипе, на который нанесены олигонуклеотиды, комплементарные отдельным разновидностям кДНК. Соотношение интенсивностей флуоресценции Су3 и Су5 в области микрочипа, соответствующей определенному гену, служит мерой относительной экспрессии этого гена в образцах. В современных микрочипах используются от десятков тысяч до миллиона и более специфичных олигонуклеотидных проб, покрывающих с многократной избыточностью известные гены практически любого модельного организма.

В настоящее время технология микрочипов постепенно уступает место технологии высокопроизводительного секвенирования (рис. 2Б). Для определения всего спектра РНК, присутствующих в клетке, могут быть применены те же технологии, что и для высокопроизводительного определения нуклеотидной последовательности отдельных геномов. Итогом такого эксперимента служит определение множества, до миллиардов, коротких последовательностей, содержащихся в суммарной РНК (транскриптом). С помощью компьютерного анализа можно выровнять эти короткие последовательности с последовательностью генома и выяснить, какие участки генома транскрибируются. Количество относящихся к данному гену коротких фрагментов РНК, выявленных с помощью высокопроизводительного секвенирования, может служить мерой экспрессии гена.

Высокопроизводительное секвенирование РНК имеет зна-

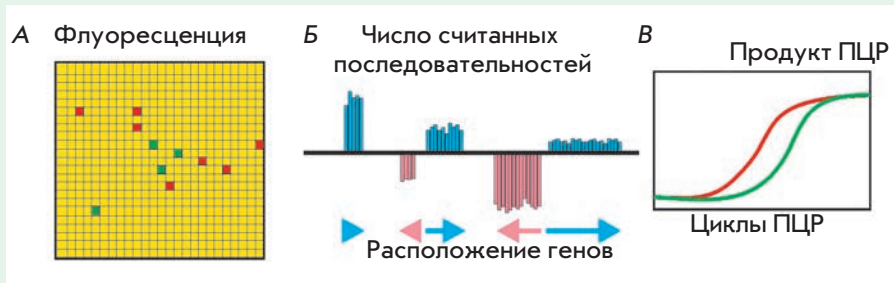


Рис. 2. Высокопроизводительные методы изучения транскрипции гена. **А** – Схема изучения уровней транскрипции с помощью микрочипов. Флуоресцентная метка вносится с помощью обратной транскрипции. Зеленым и красным флуоресцируют кДНК из двух сравниваемых образцов, помеченных флуорофорами Су3 и Су5. Сетчатый прямоугольник – микрочип с нанесенными на него олигонуклеотидными зондами. Желтые области – области, где количества соответствующей РНК в образцах совпадают; красные и зеленые – области, где преобладает кДНК, меченная Су5 или Су3 соответственно. **Б** – Схема изучения транскриптома методом высокопроизводительного секвенирования. Итогом использования метода служит график распределения обнаруженных секвенированием последовательностей по геному. Частота встречаемости последовательностей, относящихся к транскрипту, показанная синими и розовыми столбцами, служит количественной мерой экспрессии. **В** – Схема изучения экспрессии методом количественного ПЦР-анализа кДНК (RT qPCR). На графике схематично показаны кривые накопления продуктов ПЦР, соответствующих двум различным генам, в зависимости от числа циклов ПЦР. Более раннее появление продукта свидетельствует о большем количестве соответствующей мРНК в транскрипте.

чительные преимущества перед микрочипами, поскольку не предъявляет никаких требований к предварительной аннотации данного участка генома как гена. Таким образом происходит выявление множества транскриптов, не известных заранее. Кроме того, высокопроизводительное секвенирование РНК также позволяет непредвзято, т.е. не основываясь на известных заранее гипотезах, определять начало и конец транскрипта, а также варианты, образующиеся в результате альтернативного процессинга.

Обычно результаты изучения транскриптома, полученные при использовании как микрочипов, так и высокопроизводительного секвенирования РНК, в случае наиболее интересных генов проверяют с помощью количественной ПЦР кДНК (RT

qPCR) (рис. 2В). Этот метод основан на амплификации одного фрагмента кДНК (ампликона), сопряженного с количественным определением получающегося продукта в зависимости от цикла ПЦР. С этой целью измеряют интенсивность флуоресценции либо интеркалирующего в ДНК красителя, либо красителя, связанного со специально подобранным ДНК-зондом. Метод RT qPCR превосходит по надежности метод гибридизации на микрочипах и, в некоторой степени, даже высокопроизводительное секвенирование РНК. Основным недостатком RT qPCR – это возможность его использования для измерения количества только одного транскрипта в одном эксперименте. Этот недостаток можно преодолеть несколькими путями. Во-первых, использование 96-

и 384-луночных ПЦР-планшетов и соответствующих приборов позволяет детектировать множество транскриптов одновременно. В современных приборах, таких, как 7900HT («Applied Biosystems») или CFX384 («Bio-Rad»), интенсивность флуоресценции измеряют при четырех-пяти длинах волн одновременно. Кроме того, возможность автоматической загрузки планшетов из стопки повышает максимальную производительность прибора до 20 000 образцов за запуск. Этой производительности хватает для изучения экспрессии всех генов бактерии и даже примитивных эукариот. Для пипетирования такого количества ПЦР применяют автоматизированные станции, такие, как установленная в Центре коллективного пользования МГУ им. М.В. Ломоносова станция на основе Janus Extended («Perkin Elmer»).

МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ НА СТАДИИ ТРАНСЛЯЦИИ

Согласно центральной догме молекулярной биологии, экспрессия генов, кодирующих белки, происходит в два этапа. мРНК, образуемая в результате транскрипции гена, должна быть считана (транслирована) рибосомой. Рибосома синтезирует белок согласно закодированной в мРНК информации. Хотя экспрессия генов регулируется по большей части на стадии транскрипции, трансляция мРНК тоже подвержена регуляции. Известно множество интереснейших механизмов регуляции экспрессии на стадии трансляции. Еще больше механизмов, регулирующих трансляцию отдельных мРНК, предстоит понять. Для системного понимания механизмов регуляции экспрессии генов необходимо не только измерять уровни РНК, но и определять относительные количества белков

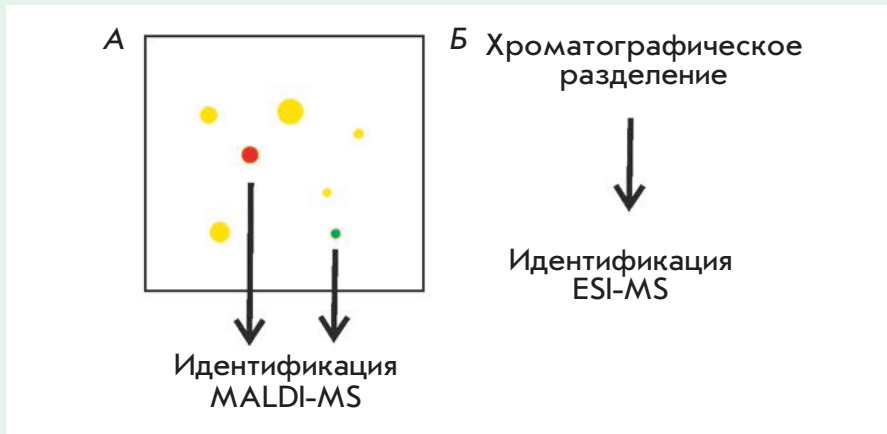


Рис. 3. Методы изучения протеома. А – Схема изучения количественных соотношений белков в двух образцах с помощью двумерного гелевого электрофореза. Стадия мечения заключается в модификации образцов белков сукцинимидными эфирами флуоресцентных красителей Су3 и Су5. После мечения образцы смешивают и разделяют на одном двумерном геле. Пятна, окрашенные желтым, соответствуют белкам, количество которых одинаково в обоих образцах. Зеленые и красные пятна соответствуют белкам, количество которых повышено в том или другом образце. Идентификация белков проводится с помощью гидролиза протеазой и масс-спектрометрического анализа полученных пептидов. Б – Схема изучения количественных соотношений белков в образце с помощью хроматографии. Препарат суммарного белка разрезают протеазой, полученные пептиды разделяют жидкостной хроматографией и анализируют с помощью масс-спектрометрии с электроспрей-ионизацией.

в клетке. Измерением количества белков занимается протеомика. Эта область науки, безусловно относящаяся к постгеномным технологиям, имеет свой инструментарий.

Стандартным методом изучения совокупности белков клетки остается двумерный белковый гелевый электрофорез (рис. 3А). Наиболее распространена система двумерного гелевого электрофореза Protean («Bio-Rad»). Как и при изучении транскриптома с помощью микрочипов наиболее информативно сравнение двух образцов, модифицированных разными флуоресцентными красителями. Как правило, используются Су3 и Су5, присоединяемые к белкам с помощью реакции гидроксисукцинимидных эфиров красителей с остатками лизина в молекулах белков. Образцы белков, моди-

фицированные Су3 и Су5, смешивают и подвергают сначала разделению по величине изоэлектрической точки. Таким способом можно отделить друг от друга белки, имеющие нейтральный заряд при различных значениях рН. Затем белки разделяют по массе с помощью гелевого электрофореза в присутствии анионного детергента додецилсульфата натрия. После разделения белков гелем сканируется на сканере флуоресценции, и по соотношению флуоресценции Су3/Су5 можно судить об относительном количестве того или иного белка в исходных образцах. Считается, что разрешающая способность каждого метода разделения составляет примерно 100 белковых полос, таким образом теоретически можно различить до 10 000 типов белков. К сожалению, в реальности такого разре-

шения достичь не удастся в силу нескольких причин. Во-первых, распределение белков клетки по изоэлектрической точке и массе не идеально. Большинство белков имеют достаточно схожие свойства. Во-вторых, количество белков в клетке различается на несколько порядков величины. Часто встречающиеся белки легко детектировать с помощью двумерного гелевого электрофореза. Редкие – практически невозможно. Таким образом, двумерный гелевый электрофорез надежен в определении количества нескольких сотен самых распространенных белков.

Идентификация белков из флуоресцирующих пятен двумерного геля проводится с помощью масс-спектрометрии. С этой целью белок разрезают на фрагменты специфической протеазой, такой, как трипсин. Затем с помощью MALDI-масс-спектрометрии анализируют массу фрагментов. В современных протеомных лабораториях чаще всего используются приборы Ultraflex («Brucker») и AB SCIEX 5800 («AB Sciex»).

Альтернативой и дополнением двумерному гелевому электрофорезу в разделении всего протеома клетки служит жидкостная хроматография с детекцией пептидов масс-спектрометром с электроспрей-ионизацией (рис. 3Б). С использованием подобных систем потенциально возможен анализ всего протеома, однако основная сложность заключается в чрезвычайном многообразии протеолитических фрагментов, получающихся при гидролизе всей совокупности клеточных белков. Без модификации белков флуорофорами, применяемой при изучении протеома с помощью двумерного гелевого электрофореза, необходимы специальные методы, позволяющие сравнивать количества белков в двух образцах только

с помощью масс-спектрометрии. Таким методом служит мечение изотопными довесками (iTRAQ). При использовании этого метода образцы белков модифицируют химически идентичными довесками, состоящими из двух частей. Эти части легко расщепляются в специальных масс-спектрометрах, имеющих режим фрагментации. Суммарные массы довесков, использующихся для мечения двух образцов, до фрагментации одинаковы. Таким образом, в масс-спектрометре одновременно анализируются два идентичных пептида с химически идентичными и равными по массе довесками, происходящими из двух образцов белка. Отличия в массе появляются только после разделения довесков на два фрагмента. Массы фрагментов отличаются, поскольку имеют различный изотопный состав. Соотношение количества фрагментов с различающейся массой будет таким же, как соотношение белков в исходной смеси.

МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ С ПОМОЩЬЮ РЕПОРТЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ

Использование современных методов протеомного анализа позволяет сравнивать количество большинства белков клетки в различных образцах. Тем не менее, протеомный анализ не может определить, на какой стадии изменилась экспрессия – на стадии транскрипции или трансляции. Для изучения каждой стадии экспрессии по отдельности, а также элементов гена, важных для того или иного механизма регуляции экспрессии, применяются репортерные конструкции. При использовании этого метода изучаемый ген заменяется на ген, кодирующий белок, количество которого в клетке легко измерить. В настоящее время в качестве репортерных конструкций широко при-

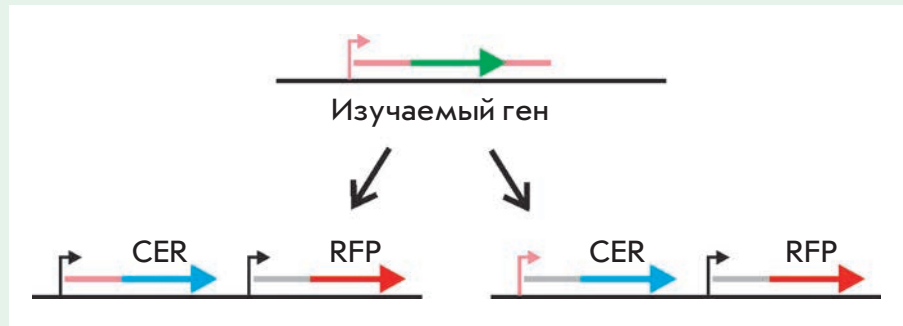


Рис. 4. Схема изучения экспрессии гена на стадиях транскрипции и трансляции с помощью репортерных конструкций. Изучаемый ген показан зеленым. Промотор и нетранспируемые участки выделены розовым. Ген красного флуоресцентного белка показан красным, а ген синезеленого – синим. Перед геном синезеленого флуоресцентного белка встраивают промотор (справа) или 5'-нетранспируемую область (слева) изучаемого гена. Экспрессия гена красного флуоресцентного белка используется в качестве внутреннего стандарта.

меняют гены β-галактозидазы, люцифераз различного происхождения и флуоресцентных белков. При создании репортерной конструкции можно использовать по отдельности элементы изучаемого гена, отвечающие за транскрипцию (промотор) и трансляцию (как правило, 5'-нетранспируемая область). Количество белка-репортера в клетке оценивают, измеряя количество продуктов модельной ферментативной реакции или, в случае флуоресцентных белков, интенсивность флуоресценции. Внутренним контролем служит сходный репортерный ген, экспрессия которого не зависит от регуляторных элементов изучаемого гена. Основная проблема при использовании репортерных конструкций – трудность их получения и детекции экспрессии для множества изучаемых генов. Метод репортерных конструкций чрезвычайно информативен в случае одного или нескольких генов, но чрезвычайно трудоемок при изучении множества, а в идеальном случае – всех генов организма. Этот недостаток можно преодолеть, используя автома-

тизированные методы клонирования репортерных конструкций и определения продуктов их экспрессии. В нашей лаборатории используются возможности автоматизированной станции на основе Janus Extended («Perkin Elmer»), установленной в Центре коллективного пользования МГУ им. М.В. Ломоносова. Автоматизированная станция позволяет выполнять клонирование, трансформацию бактерий и детекцию экспрессии репортерных генов в автоматическом высокопроизводительном режиме. В качестве репортерных генов используются гены красного флуоресцентного белка из *Entacmaea quadricolor* и синезеленого усовершенствованного варианта белка из *Aequorea macrodactyla* (рис. 4). В отличие от β-галактозидазы и люцифераз *Photinus pyralis* и *Renilla reniformis*, количества флуоресцентных белков можно измерять без разрушения клеток и использования ферментативных реакций. Эти преимущества существенно упрощают и удешевляют анализ экспрессии множества репортерных конструкций в одном эксперименте.

МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ФУНКЦИИ ГЕНОВ

Изучение функции генов не сводится к изучению их экспрессии. Для понимания функциональной роли продуктов генов необходимо выяснить, с чем взаимодействует продукт гена и к каким последствиям для клетки приводит его отсутствие. Компоненты клетки, взаимодействующие с продуктом изучаемого гена, обычно выявляют с помощью аффинного выделения продукта гена – белка или РНК. Компоненты клетки, выделяющиеся вместе с изучаемым белком или РНК, разделяют и идентифицируют. Для аффинного выделения используют либо антитела к изучаемому белку, либо типовые аффинные довески, присоединяемые к белку с помощью изменения гена этого белка. Подобная процедура не представляет особых трудностей в случае одного или нескольких белков, но становится очень трудоемкой при изучении множества белков. Получение антител к каждому белку клетки пока не представляется возможным, в отличие от высокопроизводительного изменения генов в геноме. Подобного же уровня технологии должны применяться для изучения фенотипа клеток, лишенных одного из белков. Если инактивация гена не летальна, то необходимо получить штамм или линию клеток, лишенных этого гена, т.е. провести «нокаут». Если инактивация гена приводит к нежизнеспособности, то необходимо встроить перед геном искусственно регулируемый промотор, т.е. провести «нокдаун». Для масштабирования этих исследований на всю совокупность генов требуется автоматизировать методы манипуляции с геномом. В настоящее время такие возможности имеются только для бактерий и дрожжей. Уже созданы

обширные коллекции штаммов бактерии *Escherichia coli* и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, в каждом из которых инактивирован один из генов. Также имеются частичные коллекции штаммов этих организмов, в каждом из которых один из генов содержит область, кодирующую аффинный довесок. Эти коллекции уже позволили провести частичный экспериментальный анализ фенотипов инактивации генов и изучить частичный интерактом клетки, т.е. провести каталогизацию контактов между компонентами клетки.

Сейчас высокоэффективный анализ функциональной роли генов находится на заре своего развития. Даже для модельной бактерии *E. coli* фенотипы всей совокупности штаммов нокаутов анализировали только по скорости образования колоний в различных условиях выращивания. Не создано пока и всеобъемлющей коллекции штаммов, в которых важные для жизнеспособности гены находятся под контролем регулируемых промоторов. В нашей лаборатории с использованием автоматизированной станции на основе Janus Extended («Perkin Elmer»), установленной в Центре коллективного пользования МГУ им. М.В. Ломоносова, начаты работы по введению тетрациклин-активируемого промотора перед важными для жизнеспособности генами *E. coli*.

Наиболее интересным представляется сочетание высокопроизводительных методов манипуляции с геномами, такими, как создание штаммов, содержащих «нокауты» и «нокдауны» генов, и методов высокопроизводительного анализа экспрессии генов. Подобное сочетание позволит выявить взаимное влияние активности каждого из генов на каждый ген. Заполнение подобной «ма-

трицы взаимовлияний» позволит полностью установить все регуляторные пути клетки. Основная проблема на пути решения этой задачи состоит в необходимости выполнять чрезвычайно большой объем экспериментальной работы, растущий пропорционально квадрату числа генов. Определение «матрицы взаимовлияний» всех генов *E. coli*, например, потребует постановки 17 млн экспериментов. Разумеется, это максимальное число, которое можно уменьшить за счет отсева заведомо незначительных результатов. Системное изучение взаимовлияния генов потребует полной автоматизации и существенного удешевления экспериментов. Так, для анализа экспрессии генов представляется возможным только использование репортерных конструкций на основе флуоресцентных белков, начатое в нашей лаборатории. Этот метод требует значительных вложений на этапе создания репортерных конструкций, но позволяет впоследствии проводить измерения только на основе флуоресценции, без использования каких-либо ферментативных реакций.

Важнейшую задачу постгеномной биологии представляет системный анализ всех стадий экспрессии генов, взаимовлияния экспрессии генов, функциональной роли продуктов генов и взаимодействий между продуктами генов. Созданная таким образом «матрица взаимовлияний» позволит понять функционирование всей сети регуляторных взаимодействий внутри клетки, а в перспективе управлять любыми внутриклеточными механизмами. ●

Автор благодарит
О.А. Донцову за ценные
замечания и комментарии
к тексту статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Watson J.D. // *Genome Res.* 2001. V. 11. № 11. P. 1803–1804.
2. Lewin B. *Genes VIII*. Upper Saddle River, N.J.: Pearson Prentice Hall, 2004. 1027 p.
3. Benson D.A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D., Ostell J., Sayers E.W. // *Nucl. Acids Res.* 2011. V. 39 (Database issue). P. D32–37.
4. Kennedy J., Flemer B., Jackson S.A., Lejon D.P., Morrissey J. P., O'Gara F., Dobson A.D. // *Mar. Drugs.* 2010. V. 8. № 3. P. 608–628.
5. Bork P. // *Genome Res.* 2000. V. 10. № 4. P. 398–400.
6. Crick F.H. // *Symp. Soc. Exp. Biol.* 1958. V. 12. P. 138–163.
7. Ramsay G. // *Nat. Biotechnol.* 1998. V. 16. № 1. P. 40–44.
8. Hoen P.A., Ariyurek Y., Thygesen H.H., Vreugdenhil E., Vossen R.H., de Menezes R.X., Boer J.M., van Ommen G.J., den Dunnen J.T. // *Nucl. Acids Res.* 2008. V. 36. № 21. P. e141.
9. VanGuilder H.D., Vrana K.E., Freeman W.M. // *Biotechniques.* 2008. V. 44. № 5. P. 619–626.
10. Mathews M., Sonenberg N., Hershey J.W.B. *Translational control in biology and medicine*. 3rd ed. Cold Spring Harbor monograph ser. Cold Spring Harbor, N.Y.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007. 934 p.
11. Sonenberg N., Hershey J.W.B., Mathews M. *Translational control of gene expression*. 2nd ed. Cold Spring Harbor monograph ser. Cold Spring Harbor, N.Y.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000. 1020 p.
12. Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. // *Anal. Chem.* 1996. V. 68. № 5. P. 850–858.
13. Chakravarti B., Gallagher S.R., Chakravarti D.N. // *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2005. Chapter 10. P. Unit 10 23.
14. Link A.J. *Methods in molecular biology*. Totowa, N.J.: Humana Press, 1999. V. xvii, 601 p.
15. Brewis I.A., Brennan P. // *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 2010. V. 80. P. 1–44.
16. Chalkley R. // *Methods Mol. Biol.* 2010. V. 658. P. 47–60.
17. Treumann A., Thiede B. // *Expert Rev. Proteomics.* 2010. V. 7. № 5. P. 647–653.
18. Ghim C.M., Lee S.K., Takayama S., Mitchell R.J. // *BMB Rep.* 2010. V. 43. № 7. P. 451–460.
19. Merzlyak E.M., Goedhart J., Shcherbo D., Bulina M.E., Shcheglov A.S., Fradkov A.F., Gaintzeva A., Lukyanov K.A., Lukyanov S., Gadella T.W., Chudakov D.M. // *Nat. Methods.* 2007. V. 4. № 7. P. 555–557.
20. Rizzo M.A., Springer G.H., Granada B., Piston D.W. // *Nat. Biotechnol.* 2004. V. 22. № 4. P. 445–449.
21. Casadaban M.J., Chou J., Cohen S.N. // *J. Bacteriol.* 1980. V. 143. № 2. P. 971–980.
22. Nordeen S.K. // *Biotechniques.* 1988. V. 6. № 5. P. 454–458.
23. Baba T., Ara T., Hasegawa M., Takai Y., Okumura Y., Baba M., Datsenko K.A., Tomita M., Wanner B.L., Mori H. // *Mol. Syst. Biol.* 2006. V. 2. P. 2006–2008.
24. Chu A.M., Davis R.W. // *Methods Mol. Biol.* 2008. V. 416. P. 205–220.
25. Butland G., Peregrin-Alvarez J. M., Li J., Yang W., Yang X., Canadien V., Starostine A., Richards D., Beattie B., Krogan N., et al. // *Nature.* 2005. V. 433. № 7025. P. 531–537.
26. Hu P., Janga S.C., Babu M., Diaz-Mejia J.J., Butland G., Yang W., Pogoutse O., Guo X., Phanse S., Wong P., et al. // *PLoS Biol.* 2009. V. 7. № 4. P. e96.
27. Howson R., Huh W.K., Ghaemmaghami S., Falvo J.V., Bower K., Belle A., Dephoure N., Wykoff D.D., Weissman J.S., O'Shea E.K. // *Comp. Funct. Genomics.* 2005. V. 6. № 1–2. P. 2–16.
28. Nichols R.J., Sen S., Choo Y.J., Beltrao P., Zietek M., Chaba R., Lee S., Kazmierczak K.M., Lee K.J., Wong A., et al. // *Cell.* 2011. V. 144. № 1. P. 143–156.

ОТ РЕДАКЦИИ

Поднятая тема чрезвычайно актуальна. Действительно, в последнее время во многих научных учреждениях появились самые современные, в том числе уникальные, приборы. Это обстоятельство позволяет существенно повысить уровень исследований не только в этих институтах, но, при правильном обеспечении доступа к информации, и в других центрах. Редакция считает своим долгом распространять такую информацию, и эта тема будет продолжена в следующих номерах журнала «Acta Naturae».

УДК 577.151.45:615.038

Проблемы и перспективы клинического применения ингибиторов интеграции ВИЧ-1

С. П. Королев^{1*}, Ю. Ю. Агапкина¹, М. Б. Готтих^{1,2}¹Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1²Научно-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: spkorolev@mail.ru

Поступила в редакцию 04.04.2011 г.

РЕФЕРАТ Одну из важнейших стадий репликации ВИЧ-1 – интеграцию ДНК-копии вируса в клеточную ДНК – катализирует вирусный фермент интегразы. Разработка ингибиторов интеграции ВИЧ-1 ведется более 10 лет, но к настоящему времени только один ингибитор интеграции – ралтегравир – допущен к применению в качестве лекарственного средства. Этот ингибитор хелатирует ионы металла, находящиеся в активном центре фермента, и блокирует одну из реакций, катализируемых интегразой, – перенос цепи. К сожалению, у некоторых больных вирус достаточно быстро приобретает устойчивость к ралтегравиру. На стадии клинических испытаний находятся еще несколько ингибиторов интеграции ВИЧ-1. Однако все они являются аналогами ралтегравира как по структуре, так и по механизму действия. Возникновение устойчивости вируса к некоторым из них вызвано мутациями в интегразе, сходными с мутациями, обуславливающими устойчивость к ралтегравиру. В представленном обзоре рассмотрены история создания ралтегравира и его аналогов, прохождение ими клинических испытаний, проблемы возникновения устойчивости ВИЧ-1 к ингибиторам интеграции, а также перспективы их дальнейшего применения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА интегразы ВИЧ-1, ингибирование, механизм действия, ралтегравир.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ВААРТ – высокоактивная антиретровирусная терапия; ВИЧ-1 – вирус иммунодефицита человека типа 1; ИН – интегразы; ПЦ – перенос цепи; СПИД – синдром приобретенного иммунодефицита; АУС – площадь под фармакокинетической кривой (кривая «концентрация–время») – изменение концентрации активного вещества в плазме или сыворотке крови во времени; IC_{50} – концентрация ингибитора, при которой цитопатогенное действие вируса в инфицированных клетках снижается на 50%; IC_{95} – концентрация ингибитора, при которой цитопатогенное действие вируса в инфицированных клетках снижается на 95%; Cl_p – клиренс, или коэффициент очищения – показатель скорости очищения плазмы крови от вещества в процессе его биотрансформации, перераспределения в организме, а также выведения из организма; C_{max} – максимум, или пик концентрации активного вещества в крови; EC_{50} – концентрация ингибитора, при которой репликация вируса *in vivo* подавляется на 50%; EC_{90} – концентрация ингибитора, при которой репликация вируса *in vivo* подавляется на 90%; F – биодоступность – доля введенного вещества, попавшего в неизменном виде в кровь, при пероральном приеме; FBS – фетальная сыворотка крупного рогатого скота; FDA – Управление по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными средствами США; IC_{50} – концентрация ингибитора, при которой активность фермента подавляется на 50%; NHS – нормальная сыворотка человека; PPV – доля введенного вещества, связавшегося с белками плазмы крови; $T_{1/2}$ – время, через которое концентрация вещества в плазме крови уменьшается в 2 раза; WT – дикий тип.

ВВЕДЕНИЕ

Синдром приобретенного иммунодефицита человека (СПИД) – одна из самых масштабных эпидемий конца XX – начала XXI века. СПИД вызывается вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), который

поражает иммунную систему организма. Одни из самых высоких в мире темпов роста ВИЧ-инфекции наблюдаются в Украине и в России. По некоторым оценкам, распространенность ВИЧ среди взрослого населения России составляет более 1.1% [1]. Именно

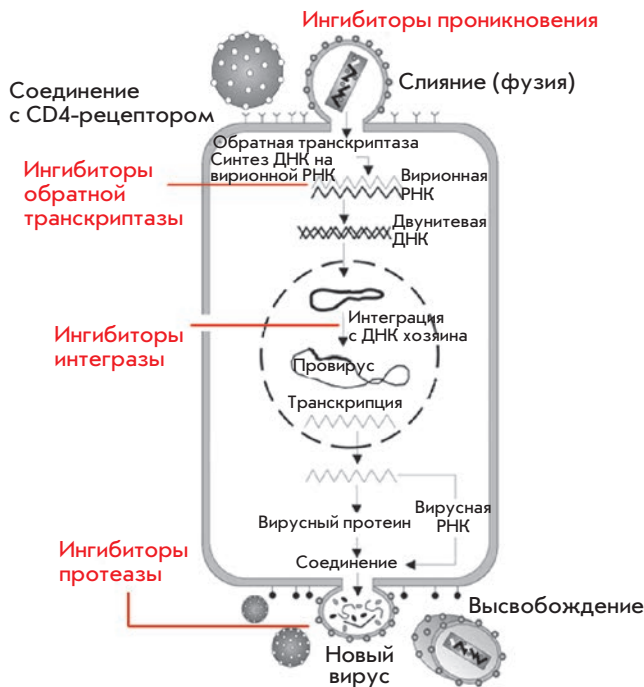


Рис. 1. Репликативный цикл ВИЧ и точки приложения ВААРТ.

поэтому разработка эффективных лекарственных средств для борьбы с этим вирусом особенно актуальна для нашей страны.

ВИЧ заражает прежде всего клетки иммунной системы: $CD4^+$ Т-лимфоциты, макрофаги и дендритные клетки. Постепенно количество $CD4^+$ -клеток сокращается, в результате чего клеточный иммунитет ослабевает, а при достижении критического уровня лимфоцитов организм становится восприимчивым к оппортунистическим инфекциям [2]. В отсутствие антиретровирусной терапии можно выделить следующие стадии течения ВИЧ-инфекции: первичная инфекция – острый ВИЧ-синдром, заканчивающийся исчезновением клинических симптомов и сероконверсией; латентная стадия (бессимптомная хроническая ВИЧ-инфекция); симптоматическая ВИЧ-инфекция (СПИД), часто сопровождающаяся развитием оппортунистических инфекций; терминальная стадия (смерть) [2].

Репликативный цикл ВИЧ-1 можно условно разделить на две фазы: раннюю и позднюю (рис. 1) [2, 3]. На ранней стадии жизненного цикла частицы вируса специфично связываются с поверхностным белком CD4 за счет специфического взаимодействия гликопротеина оболочки вируса gp120 и N-концевого домена иммуноглобулина белка CD4. Присоединение к CD4-рецептору позволяет gp120 также связаться с корецепторами (CCR5 или CXCR4) на поверхности

клетки-мишени. После связывания gp120 с корецепторами гликопротеин gp41 внедряется в мембрану клетки, что приводит к слиянию оболочки вируса и клеточной мембраны с образованием поры, через которую сердцевина вируса проникает в цитоплазму клетки [2]. После слияния вирус избавляется от оболочки и начинается процесс обратной транскрипции. Обратная транскрипция геномной РНК осуществляется вирусным ферментом, обратной транскриптазой, в цитоплазме. Продукт обратной транскрипции – двухцепочечная кДНК – транспортируется в ядро в составе прединтеграционного комплекса, включающего ряд вирусных белков: интегразу (ИН), матриксный белок МА, обратную транскриптазу, нуклеокапсидный белок NC и регуляторный белок Vpr (Viral Protein R) [4, 5], а также клеточные белки: Ku [6], HMG I(Y) [7], BAF [8] и LEDGF/p75 [9]. Ядерная локализация ИН, МА, Vpr [5] и LEDGF/p75 [9] обеспечивается сигналами ядерной локализации. После транспорта в ядро ДНК-копия интегрируется, т.е. ковалентно встраивается, в геном клетки-хозяина благодаря каталитической активности ИН [3]. Поздняя фаза репликативного цикла ВИЧ-1 начинается с регулируемой экспрессии провирусного генома, затем происходит процессинг синтезированных вирусных белков вирусной протеазой с последующей сборкой новых вирионов, которые высвобождаются из клетки и инфицируют новые клетки-мишени, завершая жизненный цикл вируса [2, 3].

При ВИЧ-инфекции применяют высокоактивную антиретровирусную терапию (ВААРТ), насчитывающую в настоящее время 25 препаратов [10]. В основном это нуклеозидные и нуклеотидные ингибиторы обратной транскриптазы ВИЧ-1 и ингибиторы протеазы. Кроме того, недавно разработаны ингибиторы проникновения: маравирик, блокирующий взаимодействие gp120 с CCR5, и энфувиртид, взаимодействующий с гликопротеином gp41 (рис. 1). В конце 2007 г. Управлением по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными средствами США (Food and Drug Administration, FDA) был одобрен к применению в качестве средства против СПИДа первый ингибитор интеграции, препарат Isentress™, или ралтегравир (МК-0518) [11].

Стадия интеграции вирусной ДНК в клеточную – одна из ключевых в репликативном цикле ВИЧ-1, поэтому катализирующая ее ИН считается одной из самых привлекательных мишеней для ингибиторов ВИЧ-1. Показано, что вирус, содержащий дефектную ИН, не способную катализировать интеграцию вирусной ДНК, не размножается в культуре клеток [12]. Кроме того, ИН не имеет клеточного эквивалента, и, следовательно, ингибиторы, специфически подавляющие ее каталитическую активность, не долж-

ны влиять на клеточные процессы и, как следствие, должны быть менее токсичными для клетки и всего организма в целом, чем ингибиторы других стадий репликативного цикла ВИЧ. Разработка ингибиторов интеграции активно велась в течение многих лет. В многочисленных обзорах [13–19] подробно описаны соединения различного типа, способные блокировать ИН. Настоящий обзор посвящен современному состоянию исследований в области применения ралтегравира и его аналогов в качестве компонентов ВААРТ.

СТРОЕНИЕ ИНТЕГРАЗЫ И МЕХАНИЗМ ИНТЕГРАЦИИ

Процесс интеграции начинается в цитоплазме и протекает в несколько стадий [20–22]. ДНК-копия вирусной РНК содержит на обоих концах длинные концевые повторы, состоящие из трех участков: U3, R и U5. На расстоянии двух нуклеотидов от 3'-конца каждой цепи ДНК находится консервативный динуклеотид CA, который встречается в длинных концевых повторах всех ретровирусов. ИН в составе прединтеграционного комплекса узнает нуклеотидные последовательности, расположенные на концах участков U3 и U5 вирусной кДНК, связывается с ними и затем катализирует реакцию 3'-концевого процессинга. Эта реакция представляет собой эндонуклеазное расщепление вирусной кДНК, в результате которого с 3'-конца каждой цепи удаляется динуклеотид GT. Расщепление субстрата происходит в результате нуклеофильной атаки молекулой воды фосфатной группы между 2-м и 3-м нуклеотидами [20–22].

Затем прединтеграционный комплекс транспортируется в ядро, где ИН катализирует стадию переноса цепи (ПЦ). Она представляет собой реакцию переэтерификации, которая включает нуклеофильную атаку 3'-гидроксильных групп процессированных цепей вирусной (субстратной) ДНК на межнуклеотидные фосфаты обеих цепей клеточной ДНК (ДНК-мишени) с образованием ковалентного продукта. Переэтерификации подвергаются межнуклеотидные связи, расположенные в различных цепях ДНК-мишени на расстоянии 5 п.н. одна от другой. Для завершения процесса интеграции требуются: процессинг 5'-концов вирусной ДНК, полимеразная достройка пяти недостающих нуклеотидов и лигирование, которые осуществляются при участии клеточных белков [20].

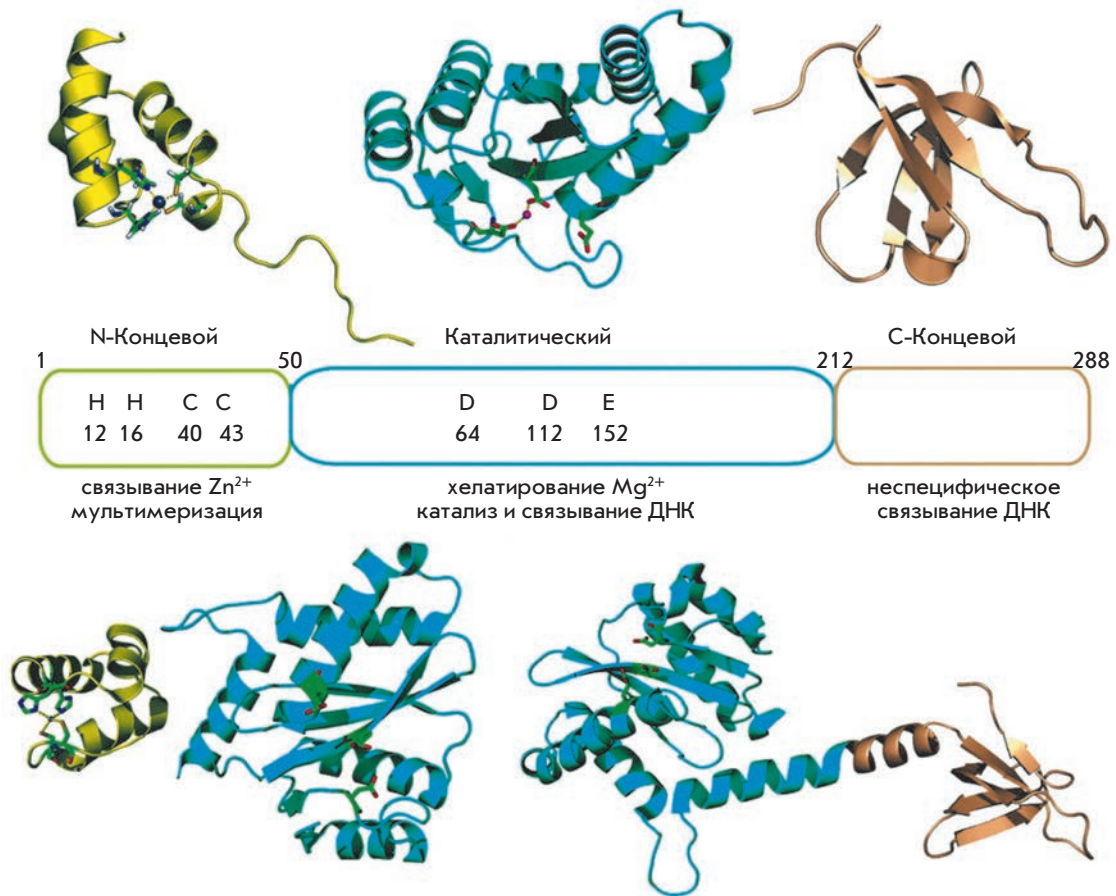
В процессе интеграции ИН должна связать два конца вирусной ДНК и клеточную ДНК. Однако до сих пор данные о взаимодействии ИН с ДНК достаточно ограничены. Интеграза ВИЧ-1 представляет собой белок, состоящий из 288 аминокислотных остатков (32 кДа), кодируемых вирусным геном *pol*. ИН транслируется в составе полипептида Gag-Pol, который затем расщепляется на отдельные белки вирусной протеазы [21]. Частичным протеолизом и на-

правленным мутагенезом показано, что в структуре фермента можно выделить три домена: N-концевой, в состав которого входят аминокислотные остатки с 1 по 50; каталитический, который образуют остатки 51–212; С-концевой, состоящий из аминокислотных остатков 213–288 (рис. 2) [20].

N-Концевой домен содержит два остатка гистидина и два остатка цистеина, консервативных у ретровирусных интеграз и ретротранспозаз [20]. Эти остатки координируют ион цинка и участвуют в образовании каталитически активного мультимера ИН, так как показано, что координация ионов Zn^{2+} стимулирует мультимеризацию ИН и ее активность [23]. В состав каталитического домена ИН входит триада инвариантных аминокислотных остатков (D64, D116 и E152 у ВИЧ-1), которые формируют активный центр ретровирусных интеграз. Каталитический домен участвует в связывании концов вирусной ДНК, благодаря взаимодействию с ними консервативных аминокислотных остатков домена, в первую очередь Q148, K156 и K159. Для интеграции ИН нуждается в присутствии ионов металла-кофактора (Mg^{2+} или Mn^{2+}), которые координируются двумя остатками, входящими в каталитическую триаду (D64 и D116) [21]. Наименее консервативный С-концевой домен формирует «SH3-подобную укладку» (Src Homology 3-like fold), этот структурный мотив вовлечен в мультимеризацию ИН, но наибольший вклад он вносит в образование и стабилизацию специфических к последовательности и неспецифических комплексов с ДНК. Нетипичный двойной сигнал ядерной локализации, расположенный в каталитическом ($^{186}KRK^{188}$) и С-концевом ($^{211}KELQKQITK^{219}$) доменах ИН, узнается участниками импортин/кариоферинного клеточного пути. Этого взаимодействия достаточно, чтобы вовлечь ПИК в систему клеточного ядерного транспорта [24].

Структура полноразмерной ИН ВИЧ-1 до сих пор не известна, удалось определить только структуру отдельных доменов и двухдоменных фрагментов ИН (см. [20]). Эти данные, а также результаты, полученные с использованием сайт-направленного мутагенеза и поперечных сшивок, используются для создания компьютерных моделей ИН [25–27]. Несмотря на то что эти модели зачастую противоречат друг другу, большинство исследователей сходятся во мнении, что в клетке ИН функционирует в форме тетрамера. Эта точка зрения подтверждается в работе [28], авторам которой впервые удалось закристаллизовать и расшифровать структуру ретровирусной ИН в комплексе с ДНК. Используемая с этой целью ИН пенящего вируса человека, относящегося к ретровирусам подгруппы *Sputnaviridae*, действует в форме тетрамера, со-

Рис. 2. Структурные домены интегразы ВИЧ-1 [14].



стоящего из асимметричных димеров, каждый из которых взаимодействует с одним концом вирусной ДНК и осуществляет его интеграцию в клеточную ДНК [28]. Сравнительное изучение каталитических характеристик ИН пенящего вируса человека и ВИЧ-1 выявило значительное сходство в «работе» этих двух ферментов [29, 30].

На каталитическую активность ИН могут влиять и клеточные, и вирусные белки, входящие в состав прединтеграционного комплекса. Для встраивания обоих концов вирусной ДНК в суперскрученную клеточную ДНК ИН ВИЧ-1 не нуждается ни в вирусных, ни в клеточных кофакторах [31]. Однако показано, что такие белки, как вирусный белок NC и клеточные HMG I(Y) и LEDGF/p75, могут увеличивать эффективность интеграции [21, 32]. Известно, что клеточный белок LEDGF/p75 непосредственно взаимодействует с ИН и стимулирует согласованную интеграцию и перенос цепи ИН [33]. Предполагается, что LEDGF/p75 может выполнять роль шаперона по отношению к ИН, стабилизировать ее мультимерную организацию и увеличивать сродство ИН к ДНК [21].

СОЗДАНИЕ ИНГИБИТОРОВ ИНТЕГРАЦИИ ВИЧ-1, ПОДАВЛЯЮЩИХ РЕАКЦИЮ ПЕРЕНОСА ЦЕПИ

В отсутствие знаний о структуре ИН ВИЧ-1 основным методом поиска ее ингибиторов долгое время был скрининг библиотек химических соединений различных классов [4]. Завершенное к 2000 г. тестирование библиотеки, состоящей из 250000 соединений, позволило специалистам компании «Merck Pharmaceuticals» (США) выявить среди них ряд с наибольшей ИН-ингибирующей активностью [34]. Все они оказались дикетосоединениями (ДКС), а именно, производными 2,4-диоксобутановой кислоты. Ингибиторы содержали так называемый мотив β-дикетокислоты, способный координировать ионы металла-кофактора в активном центре ИН [34]. Эти ингибиторы проявляли большую активность при ингибировании реакции переноса цепи, чем при ингибировании 3'-процессинга *in vitro*. Наиболее активное соединение L-731.988 (рис. 3) было в 70 раз более активным по отношению к реакции переноса цепи, чем к реакции 3'-процессинга. Кроме того, этот ингибитор подавлял развитие ВИЧ-1 в культуре клеток (табл. 1).

Проведен отбор устойчивых к действию ДКС штаммов вируса с последующим определением места мутации. В ИН устойчивого к действию L-731.988 штамма обнаружена замена остатка M154 (M154I), расположенного в непосредственной близости от остатка E152, входящего в каталитическую триаду фермента [34].

В дальнейшем [38] было детально изучено взаимодействие L-731.988 с ИН. Показано, что ингибитор в концентрациях вплоть до микромолярных не взаимодействует с изолированным ферментом. Для его связывания с ферментом необходим ДНК-субстрат – U5- или U3-концевые участки вирусной ДНК. При этом константа диссоциации (K_d) комплекса интегразы с L-731.988, определенная в присутствии 100 нМ U5-субстрата, составляла 75 нМ, что коррелировало со значением IC_{50} в реакции переноса цепи. Аффинность L-731.988 при взаимодействии с ИН, связанной с процессированной вирусной ДНК, была в 100 раз выше, чем с ИН в отсутствие вирусной ДНК ($K_d = 10-20$ мкМ). ДНК произвольной последовательности не стимулировала взаимодействие ингибитора с ферментом. Кроме того, увеличение концентрации ДНК-субстрата, избыток которого мог служить ДНК-мишенью, приводило к уменьшению связывания ингибитора с ИН. На основании этих данных предположили [38], что ингибитор L-731.988 подавляет реакцию переноса цепи, конкурируя с ДНК-мишенью за место ее связывания, причем для взаимодействия ингибитора с ИН необходима конформация активного фермент-субстратного комплекса.

Аналогичный характер ингибирования активности ИН имеет и ряд других соединений, общей чертой которых было присутствие двух атомов кислорода, способных координировать ионы металла-кофактора в активном центре ИН [39–42].

Таблица 1. Результаты исследований *in vitro* и клеточных испытаний дикетокислоты L-731.988 и производных нафтиридина L-870.810 и L-870.812 в качестве ингибиторов интеграции ВИЧ-1

Ингибитор интегразы	IC_{50} <i>in vitro</i> (перенос цепи), нМ	IC_{95} <i>ex vivo</i>
L-731.988	8–15 [34]	$IC_{50} = 1$ мкМ [34]
L-870.810	8–15 [35]	15 нМ (10% FBS) 100 нМ (50% NHS) [36]
L-870.812	40 [36]	250 нМ (50% NHS) [37]

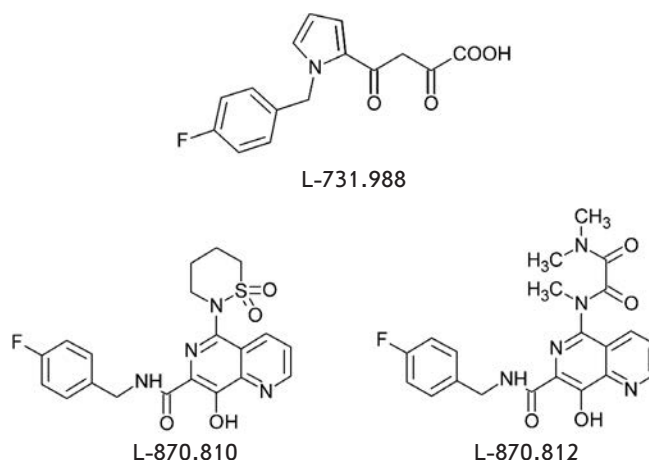


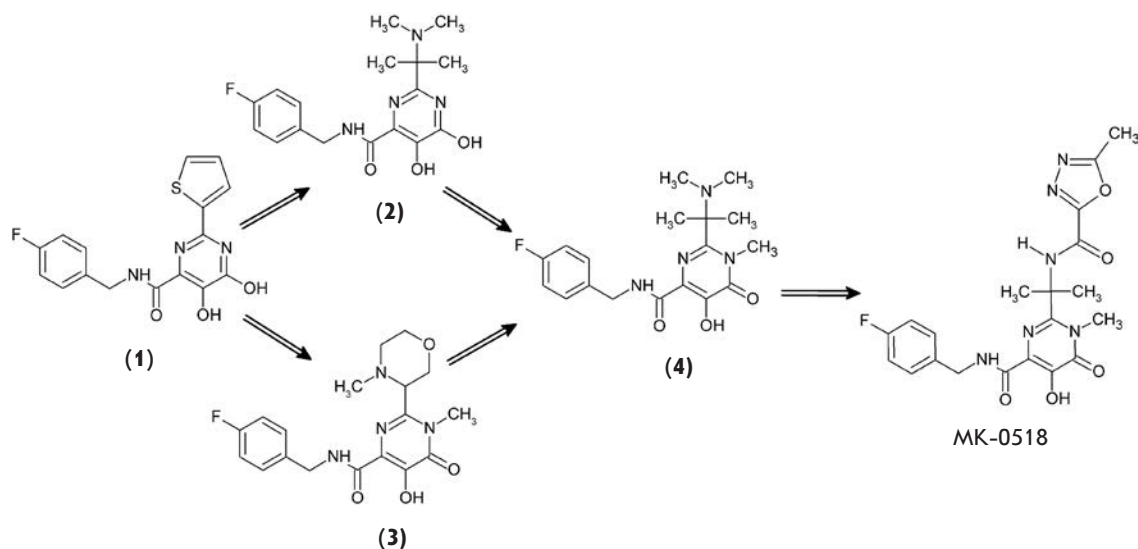
Рис. 3. Структуры ингибиторов интеграции ВИЧ-1 – L-731.988, L-870.810, L-870.812.

Поиски аналогов ДКС, проявляющих противointегразную активность, привели к созданию компанией «Merck Pharmaceuticals» производных нафтиридина. Эти соединения имели схожую с ДКС активность и селективность по отношению к реакции переноса цепи [43]. Среди ингибиторов данного структурного класса наиболее хорошо изучены два: L-870.810 и L-870.812 (рис. 3, табл. 1).

Производное нафтиридина L-870.810 вытесняло дикетокислоту L-731.988 из комплекса ИН/ДНК-субстрат, что позволило предположить возможность связывания этих соединений с ИН в едином или перекрывающихся сайтах [36]. Доказательством действия этого ингибитора на процесс интеграции служило накопление в обрабатываемых L-870.810 клетках кольцевой вирусной ДНК и снижение количества интегрированной вирусной ДНК. Селекция устойчивых к действию L-870.810 штаммов вируса приводила к следующим заменам в первичной структуре ИН: F121Y/T125K, V72I/F121Y/T125K и V72I/F121Y/T125K/V151I [36]. Вирусы, несущие соответствующие мутации, были в 4–100 раз менее чувствительны к действию L-870.810, чем ВИЧ-1 дикого типа [36]. Мутации в гене ИН, приводящие к устойчивости вируса к дикетокислотам и нафтиридинам, близко расположены, но не идентичны. Все это свидетельствует о возможности существования как общего центра связывания, так и общего механизма действия у ингибиторов обоих классов.

Ингибитор L-870.810 успешно прошел первую стадию клинических испытаний, но на второй стадии обнаружилась его токсичность для почек и печени, поэтому испытания были прекращены [44].

Рис. 4. Оптимизация производных дигидроксипиримидина (**1, 2**) и N-метилпиримидинона (**3, 4**) в качестве ингибиторов переноса цепи, осуществляемых ИН ВИЧ-1, приведшая к созданию ингибитора МК-0518 – ралтегравира.



РАЛТЕГРАВИР (МК-0518) – ПЕРВЫЙ РАЗРЕШЕННЫЙ К ПРИМЕНЕНИЮ ИНГИБИТОР ИНТЕГРАЦИИ ВИЧ-1

Создание ралтегравира

Относительный успех, достигнутый при применении в качестве ингибиторов ИН производных нафтиридина, привел к созданию ингибиторов на основе дигидроксипиримидина (соединение **(1)**, рис. 4) [45]. Это соединение специфически подавляло перенос цепи, осуществляемый рекомбинантной ИН (табл. 2), однако было неактивно в культуре инфицированных клеток даже в микромолярных концентрациях. Тем не менее, благодаря своим фармакокинетическим показателям, определенным на крысах (хорошая биодоступность ($F = 39\%$), низкий клиренс плазмы крови ($Cl_p = 11$ мг/мин/кг)), это соединение было отобрано для дальнейших структурно-функциональных исследований [45], которые позволили создать соединение **(2)** (рис. 4) [46]. Данное вещество хорошо ингибировало реакцию переноса цепи (табл. 2), а также подавляло цитопатическое действие ВИЧ-1 в инфицированных клетках [46].

Параллельные исследования привели к созданию нового класса ингибиторов ИН – производных N-алкилпиримидинона, которые в опытах *in vitro* ингибировали ИН в наномолярных концентрациях [36]. Результаты изучения ингибирующего действия соединения **(3)** (рис. 4), принадлежащего к данному классу, приведены в табл. 2 [47]. Кроме того, соединения **(2)** и **(3)** имели хороший фармакокинетический профиль и хорошую биодоступность в доклинических испытаниях, проведенных на крысах, собаках и макаках-резус [46, 47].

В дальнейшем [48] предприняли попытку объединить в одной молекуле оптимальные свой-

ства ингибиторов каждой из двух серий. Такой подход привел к созданию другого производного N-метилпиримидинона (соединение **(4)**, рис. 4). Однако соединение **(4)** оказалось менее активным (табл. 2).

Структурно-функциональное изучение производных N-метилпиримидинона в качестве ингибиторов ИН было продолжено [48]. Наиболее активным оказалось соединение МК-0518 (табл. 2), получившее название ралтегравир (рис. 4). Оказалось, что ралтегравир имеет высокую селективность по отношению к ИН и практически не ингибирует ($IC_{50} > 50$ мкМ) такие Mg^{2+} -зависимые ферменты, как обратная транскриптаза ВИЧ-1, РНК-аза Н ВИЧ-1, РНК-полимераза вируса гепатита С, а также полимеразы α , β и γ человека [48]. Не обнаружено также влияния

Таблица 2. Результаты исследований *in vitro* и клеточных испытаний производных дигидроксипиримидина, N-метилпиримидинона и ралтегравира (МК-0518) в качестве ингибиторов интеграции ВИЧ-1

Соединение	IC_{50} <i>in vitro</i> (перенос цепи), нМ	IC_{95} <i>ex vivo</i>	Ссылка
(1)	10	неактивен	[45]
(2)	50	60 нМ (10% FBS) 78 нМ (50% NHS)	[46]
(3)	60	60 нМ (10% FBS) 100 нМ (50% NHS)	[47]
(4)	250	1 мкМ (10% FBS) > 1 мкМ (50% NHS)	[48]
МК-0518	15	19 нМ (10% FBS) 31 нМ (50% NHS)	[48]

Таблица 3. Фармакокинетические параметры ралтегавира, определенные на крысах/собаках/макаках-резус [48]

Форма	AUC, мкМ·ч	C _{max} , мкМ	T _{1/2} , ч	F, %	Cl _p , мл/мин/кг	PPB, %
ОН	1.0/21/1.8	1.2/8/0.3	нд*/нд/7	37/45/8	39/6/18	74/71/85
Na ⁺	1.4/нд/нд	1.0/нд/нд	нд/нд/нд	нд/нд/нд	нд	нд
K ⁺	1.3/45/нд	1.6/24/нд	7.5/13/нд	45/69/нд	нд	нд

*нд – нет данных.

ралтегавира (в концентрации вплоть до 10 мкМ) еще на 150 различных ферментов, рецепторов и каналов. В частности, ралтегавир не действовал на различные изоформы цитохрома P450 (IC₅₀ > 50 мкМ) и не связывался с ионным каналом hERG [48].

Фармакокинетика и взаимодействие с компонентами ВААРТ

Фармакокинетический профиль ралтегавира изучен на крысах, собаках и макаках-резус [48]. Крысы получали ралтегавир в дозе 3 мг/кг в трех различных формах (ОН-форма, а также Na⁺- и K⁺-соли). Лучшие результаты были достигнуты при применении солей ралтегавира. При этом количество вещества, поступившего в кровь при однократном приеме (AUC), было максимальным у Na⁺-соли, а наибольший пик концентрации вещества в крови (C_{max}) достигался у K⁺-соли (табл. 3). Собаки получали ралтегавир в дозе 10 мг/кг в виде ОН-формы и K⁺-соли. В этом случае значения AUC и C_{max} также лучше у солевой формы препарата (табл. 3). Кристаллическую ОН-форму в дозе 10 мг/кг получали и макаки-резус, но показатели AUC и C_{max} (табл. 3) были при этом довольно низкими. Биодоступность препарата при пероральном приеме (F) также оказалась лучше у K⁺-соли, чем у ОН-формы (табл. 3). Таким образом, фармакокинетический профиль ралтегавира в виде Na⁺- и K⁺-солей оказался лучше, чем у ОН-формы, при этом солевые формы имели лучшую растворимость [48].

Клиренс плазмы крови был достаточно низким у собак и имел средние значения у крыс и макаков-резус (табл. 3). Кроме того, изучено связывание ралтегавира с белками плазмы крови (PPB) крыс, собак и макаков-резус (табл. 3) [48] и его метаболизм в микросомах печени этих животных и человека. Оказалось, что препарат метаболизируется глюкуронозилтрансферазой [48]. К такому же выводу пришли при изучении метаболизма в гепатоцитах [48] и подтвердили его результатами независимого исследования [49]. С помощью ¹H- и ¹³C-ЯМР-спектроскопии полностью охарактеризовали образование конъюгата глюкуронида с гидроксильной группой в положении 5 пиримидинового кольца ралтегавира [48].

Сравнение данных *in vivo* и *in vitro* позволило предположить [48], что фармакокинетический профиль ралтегавира у человека будет сходен с профилем препарата у собаки. Для достижения терапевтического эффекта необходимо, чтобы концентрация вещества через 12 ч после приема (C₁₂) оставалась выше CIC₉₅ = 31 нМ. Учитывая данные по связыванию ралтегавира с белками плазмы крови, метаболической стабильности, периоду его полувыведения и клиренсу, предложили при проведении клинических испытаний перорально принимать K⁺-соль ралтегавира в дозе не менее 100 мг 2 раза в день.

Фармакокинетический профиль ралтегавира определяли как на здоровых добровольцах, так и на ВИЧ-инфицированных. Два рандомизированных, плацебо-контролируемых испытания проведены на здоровых добровольцах: 32 человека получали ралтегавир однократно (10–1600 мг), 40 человек – каждые 12 ч в течение 10 дней (100–800 мг) [50]. Установлено, что ралтегавир хорошо усваивается, и его содержание в плазме крови достигает максимума (C_{max}) уже через 1 ч. Время полувыведения препарата (T_{1/2}) составило 7–12 ч. Постоянная концентрация препарата в крови достигается уже через 2 сут его приема, а после прекращения приема отмечается лишь слабое его накопление в организме [50]. Кроме того, необходимо отметить, что не обнаружено каких-либо значительных отличий при приеме препарата мужчинами и женщинами.

Фармакокинетика ралтегавира изучали также и у ВИЧ-инфицированных, не получавших ранее антиретровирусную терапию [51]. Установлено, что значения AUC и C_{max} растут в геометрической прогрессии вплоть до приема ралтегавира в дозе 400 мг дважды в день, а при дозе 600 мг увеличения этих параметров не происходит [51]. Кроме того, отмечено снижение вирусной нагрузки у ВИЧ-инфицированных примерно в 3 раза вне зависимости от количества принимаемого препарата [51]. Тем не менее, последние результаты следует учитывать с осторожностью из-за сравнительно небольшой выборки и малой продолжительности исследования.

Изучено также взаимодействие ралтегавира с различными компонентами противовирусной тера-

пии ВААРТ у здоровых добровольцев (см. [52]). Оказалось, что одновременный прием ралтегравира и ингибиторов протеаз – атазанавира и смеси атазанавир/ритонавир, несколько увеличивает концентрацию ралтегравира в крови, в то время как сам ритонавир практически не влияет на концентрацию ралтегравира. Нуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы тенофовир также практически не влиял на концентрацию ралтегравира. Прием ралтегравира вместе с типонавиром (ингибитор протеазы), маравироком (ингибитор проникновения), эфавиренцем и этравирином (оба ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы) приводил к снижению концентрации ралтегравира у здоровых добровольцев.

Только одно исследование взаимодействия ралтегравира с компонентами ВААРТ проведено на ВИЧ-инфицированных [53]. Четыре человека принимали ралтегравир (400 мг) дважды в день совместно с этравирином (ненуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы), при этом концентрация ралтегравира в крови снизилась в 4 раза. Несмотря на подобные результаты, авторы не дают никаких рекомендаций по изменению дозы ралтегравира при его применении вместе с этравирином [53]. Таким образом, становится очевидной необходимость дальнейшего изучения взаимодействия ралтегравира с компонентами ВААРТ у ВИЧ-инфицированных.

Клинические испытания

Терапия при устойчивости к ВААРТ. В первую очередь было начато изучение ралтегравира у ВИЧ-инфицированных, получавших ВААРТ и приобретших устойчивость к ее компонентам. Рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое испытание (P005) проводили в течение 24 нед в исследовательских центрах США, Европы, Латинской Америки и Азии [54]. В испытание вошли взрослые (старше 18 лет) больные с вирусной нагрузкой более 5000 копий РНК ВИЧ/мл и уровнем CD4⁺-лимфоцитов более 50 клеток/мкл, регулярно получавшие ВААРТ в течение не менее 3 месяцев и имеющие лабораторно подтвержденную генотипическую или фенотипическую резистентность как минимум к одному ненуклеозидному ингибитору обратной транскриптазы, одному нуклеозидному ингибитору обратной транскриптазы и одному ингибитору протеазы. Перед случайным распределением на группы каждому больному индивидуально оптимизировали базовый режим ВААРТ, количество принимаемых препаратов варьировало от двух до семи. Необходимо отметить, что у этих больных был крайне ограничен выбор антиретровирусных средств по причинам их непереносимости или устойчивости к ним ВИЧ-1. По-

скольку ранее показали, что одновременный прием атазанавира (ингибитор протеазы) и ралтегравира может приводить к повышению концентрации ралтегравира в крови [50], больных разделили на две подгруппы, оптимизированный режим ВААРТ в одной из которых включал атазанавир, а во второй – нет [54].

В исследование вошли 175 человек. Все они были разделены на группы, которым давали разные дозы ралтегравира или плацебо (табл. 4). Клинико-демографические характеристики групп были сходными. Все больные прошли 24-недельный курс терапии. Ралтегравир в качестве добавки к оптимизированному режиму ВААРТ во всех дозах был эффективнее плацебо. Во всех группах, принимавших ралтегравир, отмечалось среднее снижение вирусной нагрузки на 100 копий/мл, которое начиналось уже на 2-й нед и стойко сохранялось вплоть до 24-й (табл. 4). Снижение вирусной нагрузки сопровождалось повышением уровня CD4⁺-клеток (табл. 4). Совместное применение ралтегравира и энфувертида (ингибитор проникновения) или атазанавира в составе ВААРТ особенно улучшало вирусологический и иммунный ответ. Участие в испытании по причине неэффективности прекратил 41 больной – 14 (11%) из 144, получавших ралтегравир, и 27 (60%) из 45, получавших плацебо. Ралтегравир показал себя высокобезопасным препаратом: большинство побочных эффектов были легкими или средней тяжести. Всего двое больных прекратили участие в исследовании по причине побочного действия ВААРТ – один в группе ралтегравира и один в группе плацебо [54].

С результатами испытания P005 [54] в целом хорошо согласуются результаты продолжительного исследования BENCHMRK-1 и -2 [55], посвященного изучению эффективности и безопасности применения ралтегравира у больных, ранее получавших ВААРТ. В результате 96-недельного исследования обнаружили, что у больных, принимавших ралтегравир, более значительно снижается вирусная нагрузка и повышается уровень CD4-клеток, чем у больных, получавших плацебо (табл. 4). Необходимо отметить, что наилучшие результаты достигнуты при использовании ралтегравира в сочетании с дарунавиром (ИП) и энфувертидом, которые эти больные ранее не принимали [55].

Первичная терапия. Показав хорошие результаты у ранее получавших ВААРТ больных, ралтегравир стал привлекательным в качестве первичного препарата для ВИЧ-инфицированных, ранее не получавших ВААРТ. В двух сериях клинических испытаний (P004 [56] и STARTMRK-1 и -2 [57]) сравнивали действие ралтегравира и эфавиренца (ненуклеозидный

Таблица 4. Результаты клинических испытаний ралтегравира

Название и продолжительность испытаний	Терапевтическая стратегия	Доля больных с неопределяемой вирусной нагрузкой (< 50 копий/мл)	Уровень CD4-клеток, клеток/мкл	Ссылка
Терапия при устойчивости к ВААРТ				
P005, 24 нед	200 мг рал.*, 41 ч	65	63	[54]
	400 мг рал., 45 ч	56	113	
	600 мг рал., 44 ч	67	94	
	Плацебо, 45 ч	13	5	
BENCHMRK-1 и -2, 96 нед	400 мг рал., 462 ч	58	123	[55]
	Плацебо, 237 ч	26	49	
Первичная терапия				
P004, 48 нед	100 мг рал., 41 ч	85	221	[56]
	200 мг рал., 40 ч	83	146	
	400 мг рал., 41 ч	88	144	
	600 мг рал., 40 ч	88	187	
	600 мг эфв.**, 39 ч	87	170	
STARTMRK-1 и -2, 48 нед	400 мг рал., 281 ч	86	189	[57]
	600 мг эфв., 282 ч	82	163	
Поддерживающая терапия				
CHEER, 24 нед	400 мг рал., 52 ч	94	32	[58]

*рал. – ралтегравир.

**эфв. – эфавиренц.

ингибитор обратной транскриптазы). Дополнительно к этим препаратам испытуемые получали тенофовир и ламивудин (оба нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы) P004 [56] или только тенофовир STARTMRK-1 и -2 [57]. Оказалось, что ралтегравир не уступает эфавиренцу в способности снижать вирусную нагрузку ниже 50 копий/мл; уровень CD4-клеток также был сравнимым у этих препаратов (табл. 4). Помимо этого, терапевтический эффект у ралтегравира наступал раньше, чем у эфавиренца [57]. Хотя причины подобного эффекта остаются неясными, это свойство ралтегравира может найти применение при необходимости быстро снизить вирусную нагрузку после заражения ВИЧ, а также для снижения риска внутриутробного заражения плода от ВИЧ-инфицированной матери. Необходимо также отметить, что в целом результаты, показанные в исследованиях P004 и STARTMRK-1 и -2, были лучше, чем в исследованиях P005 и BENCHMRK-1 и -2 (табл. 4). Этот результат свидетельствует в пользу раннего начала приема ралтегравира ВИЧ-инфицированными.

Поддерживающая терапия. Помимо использования ралтегравира в качестве лекарственного средства

лицами, ранее не получавшими ВААРТ, а также устойчивыми к компонентам ВААРТ, предложено с целью снижения побочных эффектов заменять ралтегравиром антиретровирусные средства у больных с неопределяемой вирусной нагрузкой. В исследование CHEER [58] вошли 52 человека с вирусной нагрузкой менее 50 копий/мл, ранее получавших энфувертид (ингибитор проникновения). Спустя 24 нед после перевода на ралтегравир у 49 больных сохранилась неопределяемая вирусная нагрузка (табл. 4). На основании этих результатов можно сделать вывод, что замена энфувертида ралтегравиром представляется вполне безопасной.

Безопасность

Безопасность ралтегравира изучали как у ВИЧ-инфицированных, ранее не получавших ВААРТ, так и у больных, у которых развилась устойчивость к компонентам ВААРТ. Все испытания показали хорошую переносимость препарата [51, 56, 57]. Ралтегравир также оказался безопаснее эфавиренца при первичной терапии ВИЧ-инфицированных [57]. Безопасность ралтегравира испытывали на больных, ранее получавших ВААРТ. Примерно у 3.5% принимавших ралтегравир больных обнаружили рецидив-

ные или прогрессирующие формы рака, в то время как у лиц, принимавших плацебо, этот показатель составлял 1.7%. Наиболее распространенными были саркома Капоши, лимфома, рак печени и др. [54]. Тщательный анализ всех случаев развития рака у лиц, принимавших ралтегравир, не выявил корреляции между приемом препарата и появлением злокачественных новообразований [52].

Рекомендации к применению

Ралтегравир успешно прошел все стадии клинических испытаний и в октябре 2007 г. был одобрен FDA в качестве лекарственного средства для больных, приобретших устойчивость к компонентам ВААРТ [11], а в июле 2009 г. FDA разрешило использовать ралтегравир и при первичной терапии ВИЧ-инфицированных [59]. Ралтегравир получил торговое название Isentress™, он выпускается в виде таблеток по 400 мг для перорального приема дважды в день.

Возникновение устойчивости к ралтегравиру

Ралтегравир достаточно успешно применяется в качестве одного из компонентов ВААРТ, однако ряд больных оказался невосприимчивым к этому препарату [60]. Во время испытаний BENCHMRK-1 и -2 было установлено, что примерно у 25% больных спустя 48 нед после начала приема ралтегравира развивается устойчивость к нему. От 94 таких больных выделили изоляты вируса. В 30 из них не обнаружили мутаций в гене ИН, тогда как в оставшихся 64 возникновение устойчивости было связано именно с такими мутациями [60]. Устойчивость к ингибиторам переноса цепи связана, как правило, с мутациями в активном центре ИН [61]. Изоляты вируса, устойчивые к ралтегравиру, содержали первичные мутации именно в активном центре: Y143R/C, Q148K/R/H и N155H [60]. У большей части больных (48 из 64) вирус имел две и более мутаций. Как правило, это были одна из первичных мутаций и одна или несколько вторичных мутаций. Первичная мутация Y143R/C была связана со вторичными мутациями L74A/I, E92Q, T97A, I203M и S230R, а мутация Q148K/R/H ассоциировалась с мутациями G140S/A и E138K. Первичная мутация N155H была связана с рядом вторичных мутаций: L74M, E92Q, T97A, V151I и G163R [60]. Помимо этого, установлено, что мутации, как правило, со временем накапливаются. Это, в первую очередь, относится к замене Q148R, которая делает вирус практически невосприимчивым к ралтегравиру. Доля носителей вируса с такой мутацией среди больных, резистентных к ралтегравиру после 48 нед лечения, равнялась 27%, а через 96 нед их доля возросла до 53%. В то же время доля носителей

вируса с мутацией N155H уменьшилась с 45 до 18% [60]. Вероятность возникновения нечувствительности к ралтегравиру снижалась у лиц со сниженной вирусной нагрузкой (< 100000 копий/мл), а также у принимавших другие активные антиретровирусные препараты.

Аналогичная картина обнаружена во время испытания P005 [54]. У 20 человек из 35, оказавшихся невосприимчивыми к ралтегравиру, вирус содержал преимущественно мутацию Q148K/R/H, а у 14 – N155H. Мутация N155H снижала чувствительность ВИЧ к воздействию ралтегравира в 10 раз, в то время как мутация Q148K/R/H – в 25 раз. Мутация Q148K/R/H, как и в испытании BENCHMRK-1 и -2, оказалась сопряжена со вторичными заменами E138K и G140S/A. В случае N155H обнаружены вторичные мутации L74M, E92Q и G163R и не найдены замены T97A и V151I. Вероятность возникновения устойчивости также снижалась при пониженной вирусной нагрузке и при дополнительном использовании активных компонентов ВААРТ [54].

Интересны также полученные недавно данные работы [62], в которой изучали действие ралтегравира на реакцию переноса цепи, осуществляемую ИН дикого типа или ИН, содержащей мутацию G140S, Q148H, либо двойную мутацию G140S/Q148H. Оказалось, что в то время как мутация G140S приводит к появлению лишь небольшой устойчивости ($IC_{50}(WT) = 10 \text{ нМ}$, $IC_{50}(G140S) = 30 \text{ нМ}$), ИН с мутациями Q148H или G140S/Q148H имеет очень высокую устойчивость к ралтегравиру ($IC_{50}(Q148H) > 700 \text{ нМ}$, $IC_{50}(G140S/Q148H) > 1000 \text{ нМ}$). Помимо этого, было установлено, что мутация G140S в гене ИН восстанавливает слабую инфекционность вируса с мутацией Q148H до уровня вируса дикого типа [62].

АНАЛОГИ РАЛТЕГРАВИРА – ИНГИБИТОРЫ ИНТЕГРАЦИИ ВИЧ-1

Появление нового лекарственного средства, как и любой другой инновации, вызывает бурный рост числа его аналогов. Учитывая примерную стоимость разработки, испытаний и внедрения одного препарата, равную примерно 2 млрд долларов США, а также тот факт, что только одному из трех новых лекарственных средств удается оправдать эти расходы [18], можно только представить, как велик соблазн фармацевтических компаний избежать трудностей разработки абсолютно нового препарата и ограничиться модификацией наилучшего на данный момент. Поэтому ралтегравир – единственный на данный момент разрешенный к применению ингибитор интегразы ВИЧ – представляет огромный интерес в качестве отправной точки при разработке ингибиторов интеграции. Аналоги ралтегравира, как правило, пред-

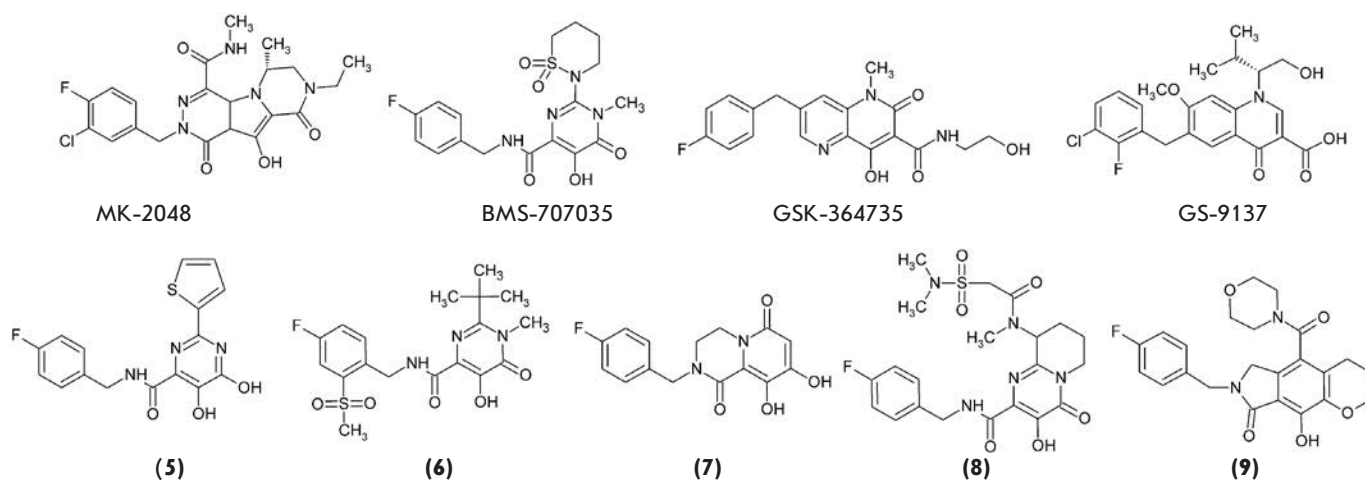


Рис. 5. Структуры ингибиторов интеграции ВИЧ-1 – аналогов ралтегравира: MK-2048, BMS-707035, GSK-364735, GS-9137, а также новых ингибиторов, представителей различных структурных классов: дигидроксипириимидина (5), N-метилпириимидинона (6), дигидроксипиридопипразин-1,6-диона (7), бициклического пириимидинона (8), пирролхинолона (9).

ставляют собой соединения, созданные на основе дикетокислот, специфически подавляющие реакцию переноса цепи ИН за счет хелатирования ионов Mg^{2+} в активном центре фермента [18]. В данном разделе мы хотели бы особо остановиться на ингибиторах переноса цепи, допущенных до стадии клинических испытаний.

MK-2048

Вскоре после получения разрешения на применение ралтегравира в качестве лекарственного средства компанией «Merck Pharmaceuticals» была предпринята попытка воссоздать фармакофор, характерный для дикетокислот и способный взаимодействовать с ионом металла, на основе производных трициклического гидроксипиррола [63]. Это привело к созданию ингибитора MK-2048 (рис. 5), который проявлял высокую ингибирующую активность во всех экспериментах (табл. 5). Ингибитор имеет неплохой фармакокинетический профиль и, что наиболее важно, потенциально активен по отношению к четырем мутантным формам ИН, устойчивым к ралтегравиру. В настоящее время проходит клинические испытания [18].

BMS-707035

В структуре этого ингибитора объединены структурно-функциональные мотивы ингибиторов L-780.810 и ралтегравира [16]. BMS-707035 отличается от ралтегравира только заменой оксадиазольной группировки на циклическую сульфонамидную группу (рис. 5) и имеет сходную с ралтегравиrom ингибирующую активность *in vitro* (табл. 5). BMS-707035

дошел до второй стадии клинических испытаний, однако в ответ на терапию практически сразу возникли многочисленные мутации в гене ИН, приводящие к появлению устойчивых штаммов ВИЧ [16]. В начале 2008 года клинические испытания BMS-707035 были приостановлены.

GSK-364735

На основе одного из первых ингибиторов переноса цепи S-1360 [42] объединенной компанией «Shionogi-GlaxoSmithKline Pharmaceuticals» разработан ингибитор GSK-364735 (рис. 5), представляющий собой производное нафтиридинона [68]. Он эффективно подавлял репликацию ВИЧ в МТ-4-клетках (табл. 5) и при этом обладал низкой цитотоксичностью ($CC_{50} > 10 \mu M$). Изучение действия GSK-364735 на штаммы ВИЧ, содержащие мутации в гене ИН, показало, что ингибитор несколько более активен по отношению к вирусам с мутациями T66I (в 1.2 раза), E92Q (в 3.7 раза), P145S (в 1.4 раза), Q146R (в 1.7 раза), Q153Y (в 1.4 раза), чем к вирусу дикого типа. Однако обнаружено значительное снижение активности ингибитора GSK-364735 в случае четырех основных мутаций в гене интегразы ВИЧ-1, которые приводят к возникновению устойчивости: в 17 раз в случае мутации T66K, в 210 раз – Q148K, в 73 раза – Q148R и в 23 раза – N155H [68]. На стадии доклинических испытаний было установлено, что GSK-364735 имеет приемлемый фармакокинетический профиль: показатели биодоступности F (42, 12 и 32%), период полувыведения из плазмы крови $T_{1/2}$ (1.5, 1.6 и 3.9 ч) и клиренс плазмы Cl_p (3.2, 8.6 и 2 мл/мин/кг) были соответственно получены на кры-

Таблица 5. Результаты исследований *in vitro* и клеточных испытаний аналогов ралтегравира в качестве ингибиторов интеграции ВИЧ-1

Соединение	IC ₅₀ <i>in vitro</i> (перенос цепи), нМ	IC ₉₅ <i>ex vivo</i>	Ссылка
МК-2048	10	35 нМ (50% NHS)	[63]
BMS-707035	20	-	[16]
GSK-364735	8	EC ₅₀ = 1.2 нМ EC ₉₀ = 42 нМ (20% NHS)	[68]
S/GSK1349572	2.7	EC ₅₀ = 0.5 нМ EC ₉₀ = 2 нМ	[13]
GS-9137 (элвитегравир)	7	EC ₅₀ = 0.7 нМ EC ₉₀ = 1.7 нМ (20% NHS)	[72]
(5) (дигидроксипиримидин)	10	> 10 мкМ (10% FBS)	[48]
(6) (N-метилпиримидинон)	20	10 нМ (10% FBS) 20 нМ (50% NHS)	[64]
(7) (дигидроксипиридопиразин-1,6-дион)	100	310 нМ (10% FBS) 310 нМ (50% NHS)	[65]
(8) (бициклический пиримидинон)	7	16 нМ (10% FBS) 31 нМ (50% NHS)	[66]
(9) (пирролхинолон)	13	7 нМ (10% FBS) 16 нМ (50% NHS)	[67]

сах, собаках и макаках-резус [68]. Препарат имел неплохие показатели на первой стадии клинических испытаний: установлено, что GSK-364735 способен более чем в 100 раз снижать вирусную нагрузку, однако на второй стадии клинические испытания были прекращены из-за выявленной гепатотоксичности [68, 69].

S/GSK1349572

Компания «Shionogi-GlaxoSmithKline Pharmaceuticals» сообщила также о создании высокоэффективного ингибитора S/GSK1349572 (табл. 5) [70]. Авторы не раскрывают структуру этого соединения, но сообщают, что ингибитор специфично ингибирует реакцию переноса цепи, и механизм его действия основан на хелатировании ионов Mg²⁺ в активном центре ИН [70]. Это позволяет нам предварительно отнести S/GSK1349572 к аналогам ралтегравира, если не по структурным характеристикам, то, по крайней мере, по механизму его воздействия на ИН. Использование этого препарата приводит к появлению мутаций в гене ИН, однако они не способны обеспечить высокую степень устойчивости вируса по отношению к S/GSK1349572. Интересно, что ингибитор оказался активен по отношению к штаммам ВИЧ, устойчивым к ралтегравиру [70] и элвитегравир (см. ниже). По-видимому, этот препарат имеет иной профиль резистентности [14]. Тем не менее, некоторые вторичные мутации, дополняющие G140S/Q148H, например

T97A, M154I или V201, вызывают устойчивость к S/GSK1349572. Кроме того, выявлены множественные мутации, например V75I/E138K/G140S/Q148H/M154I, вызывающие устойчивость и к S/GSK1349572, и к ралтегравиру [71]. Эти данные указывают на необходимость дальнейшего изучения возникновения устойчивости ВИЧ-1 к этому ингибитору.

На 26 здоровых добровольцах установлено, что S/GSK1349572 имеет весьма хороший фармакокинетический профиль, в частности, биодоступность препарата при пероральном приеме составила примерно 70%, а период полувыведения его из плазмы крови T_{1/2} превысил 15 ч [70]. В настоящий момент продолжается вторая стадия клинических испытаний S/GSK1349572 [70].

GS-9137 (элвитегравир)

Попытки компании «Japan Tobacco» (Япония) модифицировать фармакофор ДКС привели к созданию группы ингибиторов ИН на основе 4-оксохинолина, которые сохранили расположение основных функциональных групп, необходимых для взаимодействия с ионами металлов [72]. Подписанное в 2005 году соглашение о сотрудничестве между «Japan Tobacco» и «Gilead Sciences» (США) положило начало клиническим испытаниям ингибитора GS-9137 (рис. 5) [16], названного элвитегравир и наиболее активного представителя ингибиторов ИН данного структурного класса (табл. 5). Фармакокинетический профиль эл-

витегравира изучен на крысах и собаках [73]. Препарат имел неплохие показатели биодоступности F (34 и 30%), периода полувыведения из плазмы крови $T_{1/2}$ (2.3 и 5.2 ч) и клиренса плазмы Cl_p (8.3 и 17 мл/мин/кг) у крыс и собак соответственно [73].

Фармакокинетический профиль элвитегравира изучен на здоровых [74] и ВИЧ-инфицированных [75] добровольцах. Установлено, что элвитегравир быстро усваивается (3.5–4 ч), при увеличении дозы элвитегравира наблюдалось также увеличение параметров C_{max} и АУС. Наилучшие результаты получены, если элвитегравир принимали совместно с ритонавиром (ингибитор протеазы) [75]. В отличие от ралтегравира, элвитегравир метаболизируется цитохромом P450 (CYP3A4) [74]. Стимулирующее действие ритонавира, вероятно, объясняется его способностью ингибировать цитохром P450 и тем самым поддерживать более высокую концентрацию элвитегравира. Изучено также взаимодействие элвитегравира с нуклеозидным и ненуклеозидным ингибиторами обратной транскриптазы и ингибитором проникновения маравироком. Оказалось, что эти ингибиторы не оказывают значительного влияния на эффективность действия элвитегравира [74].

Рандомизированное изучение терапевтической активности элвитегравира проведено на 278 ВИЧ-инфицированных, ранее получавших ВААРТ и приобретших устойчивость к ее компонентам [76]. Больные с вирусной нагрузкой порядка 30000 копий/мл и уровнем CD4-лимфоцитов около 200 клеток/мкл получали элвитегравир 1 раз в день совместно с ритонавиром. После 24 нед испытаний у 90% больных, принимавших элвитегравир, вирусная нагрузка снизилась не менее чем в 10 раз. В 100 раз была снижена вирусная нагрузка у 76% лиц, получавших 125 мг элвитегравира, и у 69% больных, получавших 50 мг элвитегравира [76]. Также проведено исследование на 40 ВИЧ-инфицированных добровольцах с вирусной нагрузкой 10000–300000 копий/мл и средним уровнем CD4-клеток примерно 200 клеток/мкл, которые получали элвитегравир в различных дозах 1 или 2 раза в день либо 1 раз в день вместе с ритонавиром. Спустя 10 дней вирусная нагрузка снизилась в среднем в 80 раз в группах, принимавших элвитегравир дважды в день, а также принимавших элвитегравир совместно с ритонавиром. Однако статистически значимого изменения уровня CD4-клеток не обнаружено [75].

Рандомизированное, двойное слепое изучение действия элвитегравира на ВИЧ-инфицированных добровольцах, ранее не получавших ВААРТ, проводили в течение 48 нед [77]. Испытуемых разделили на две группы: одна получала смесь элвитегравира с ингибитором цитохрома P450 кобицистатом,

а вторая – ненуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы эфавиренц. Кроме того, обе группы получали два нуклеозидных ингибитора обратной транскриптазы – эмтрицитабин/тенофовир. Оказалось, что доля больных с неопределяемой вирусной нагрузкой в обеих группах достигла 83% через 24 нед и 90% после 48 нед [77]. Таким образом, элвитегравир показал высокую эффективность, сравнимую с эффективностью широко применяемого противовирусного средства эфавиренца.

Информация о безопасности элвитегравира ограничена результатами второй фазы испытаний, во время которой ВИЧ-инфицированные получали смесь элвитегравира/ритонавира или конкурентный ингибитор протеазы [76]. Не обнаружено заметных различий между двумя группами ни по частоте побочных эффектов, ни по их тяжести. Для подтверждения безопасности элвитегравира в терапии ВИЧ-инфицированных необходимы дополнительные исследования. На настоящий момент элвитегравир находится на третьей стадии клинических испытаний.

Анализ возникновения устойчивости у лиц, принимавших элвитегравир, ограничен данными, полученными на изолятах ВИЧ, выделенных от больных, участвующих во второй стадии клинических испытаний [52, 78]. Наиболее часто встречались первичные мутации E92Q, T66I/A/K, E138K, S147G, Q148R/H/K и N155H в интегразе ВИЧ-1, которые связывают также с устойчивостью к другим ингибиторам, разработанным на основе ДКС, и, в первую очередь, к ралтегравиру [79]. Хотя бы одна из первичных мутаций встречалась у 39% лиц, устойчивых к элвитегравиру. Помимо этого обнаружена перекрестная устойчивость к ралтегравиру: в среднем 150-кратное снижение восприимчивости к элвитегравиру приводило также к 30-кратному снижению восприимчивости к ралтегравиру. Перекрестная устойчивость ВИЧ к действию ралтегравира и элвитегравира подтверждается и результатами клеточных испытаний, приведенными в работе [80]. В этой работе выделены штаммы ВИЧ, устойчивые к элвитегравиру, и обнаружено, что у них повышена устойчивость к ралтегравиру, а также к производным дикетокислоты L-731.988 и нафтиридина L-870.810.

Новые ингибиторы интеграции ВИЧ-1, созданные на основе ралтегравира

Проведение большого количества исследований, направленных на поиск новых ингибиторов ИН на основе ралтегравира, привело к разработке ингибиторов ИН нескольких новых структурных классов. Все они специфически ингибируют реакцию переноса цепи и содержат функциональные группы, способные хе-

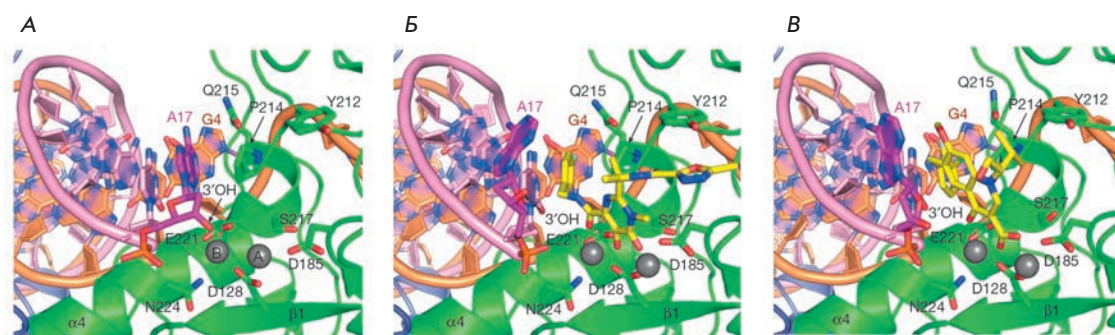


Рис. 6. Структура активного центра интегразы пенящего вируса человека без ингибитора (А); в присутствии ингибиторов МК-0518 (Б) и GS-9137 (В) [28].

латировать ионы металла в активном центре ИН [18]. Названия новых структурных классов ингибиторов ИН, структура отдельных представителей (рис. 5) с указанием их активности в исследованиях *in vitro* и клеточных испытаниях, а также данные по изучению фармакокинетики на крысах, представлены в табл. 5.

Проблемы применения аналогов ралтегравира в качестве ингибиторов интеграции

Все данные, изложенные выше, указывают на то, что известные аналоги ралтегравира действуют на интегразу ВИЧ-1 по одному и тому же механизму, содержат сходный структурный мотив и проявляют сравнимую активность *in vitro* и в клеточных испытаниях. Идентичность подобного рода ставит под сомнение успех будущего применения данных ингибиторов в качестве лекарственных средств. Эти опасения вызваны перекрестной резистентностью вируса к этим ингибиторам.

Возникновение перекрестной устойчивости можно объяснить, в первую очередь, схожим механизмом связывания ингибиторов переноса цепи с комплексом ИН и вирусной ДНК [14]. Эти соединения связываются таким образом, что «выталкивают» 3'-концевую гидроксил процессированной цепи ДНК из активного центра фермента и тем самым блокируют интеграцию. Этот механизм связывания предложен для ИН ВИЧ-1 [81], а затем показан для фермента пенящего вируса человека (рис. 6) [28]. Причем в последней работе впервые показали, что место 3'-гидроксила занимает фторбензильный остаток ингибитора, совершенно необходимый структурный элемент всех ингибиторов переноса цепи (рис. 4, 5).

Используя данные рентгеноструктурного анализа каталитического домена ИН в комплексе с Mg^{2+} (1BL3) [18], провели молекулярный докинг некоторых ингибиторов ИН, разработанных на основе ДКС. Согласно предложенной модели, ралтегравир взаимодействует с остатками T66, E92, Y143, Q148 и N155, замены которых приводят к 5–35-кратному

снижению восприимчивости к ралтегравиру [48, 82]. Молекулярный докинг также подтвердил, что аминокислотные остатки, с которыми взаимодействуют GSK-364735 и GS-9137, идентичны тем, с которыми взаимодействует ралтегравир [83, 84], за исключением G140, сближение с которым наблюдается только в случае элвитегравира [18]. Этот результат согласуется с данными о том, что мутация G140S в 4 раза снижает восприимчивость ВИЧ-1 к элвитегравиру и лишь в 1.6 раза к ралтегравиру.

Молекулярный докинг некоторых новых ингибиторов ИН (рис. 5) показал, что эти соединения связываются с ИН аналогично ралтегравиру. Таким образом, если результаты проведенного в работе [18] исследования корректны, то весьма маловероятно, что новые ингибиторы, созданные на основе ралтегравира, могут оказаться активными по отношению к штаммам ВИЧ, устойчивым к ралтегравиру, а значит, стать его адекватной заменой.

Еще одна проблема, способная осложнить успешное применение ингибиторов интеграции, – недостаток наших знаний о полиморфизме ИН у ВИЧ-1 различных подтипов. К настоящему времени проведено только одно исследование, в котором проверяли чувствительность к ралтегравиру 137 клинических изолятов, из которых 60 не принадлежали к В-подтипу [85]. Никаких различий обнаружено не было. Однако в опытах *in vitro* показано, что ИН вируса подтипа С, содержащая мутацию E92Q/N155H, в 10 раз более чувствительна к ралтегравиру и элвитегравиру, чем фермент ВИЧ-1 подтипа В [86]. Показано также, что у вируса подтипа CRF02_AG реже возникают мутации остатка G140, чем у подтипа В [87]. Есть данные и о том, что ралтегравир чаще оказывается неэффективным у лиц, инфицированных вирусом не-В-подтипа [88].

АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ПУТИ ИНГИБИРОВАНИЯ ИНТЕГРАЦИИ ВИЧ-1

На наш взгляд, оптимальный альтернативный путь поиска ингибиторов интеграции ВИЧ-1 состоит в соз-

дании ингибиторов, действующих по другому механизму, чем ралтегравир и его аналоги, специфично ингибирующие перенос цепи. Позволим себе ограничиться краткой характеристикой нескольких классов ингибиторов ИН, отличающихся по механизму действия от ингибиторов переноса цепи, и указанием некоторых их представителей.

Ингибиторы 3'-процессинга

Ингибиторы этого класса, как правило, подавляют обе стадии интеграции: и 3'-процессинг, и перенос цепи. Это происходит благодаря тому, что они взаимодействуют с активным центром самого фермента, а не с его комплексом с ДНК-субстратом. Это весьма многочисленный класс ингибиторов, но наиболее изученными ингибиторами 3'-процессинга являются стирилхинолины [89]. Стирилхинолин KHD161 (рис. 7) практически одинаково действует и на 3'-процессинг ($IC_{50} = 2.4$ мкМ), и на перенос цепи ($IC_{50} = 1$ мкМ), он способен подавлять цитопатическое действие ВИЧ-1 в клетках с $SI_{50} = 1.3$ мкМ [90, 91]. Известно, что стирилхинолиновые ингибиторы ИН не способны разрушать пресформированный комплекс ИН с ДНК-субстратом и не ингибируют реакцию 3'-процессинга с его участием, кроме того, способность стирилхинолинов связываться с ИН зависит от ионов Mg^{2+} [92]. Таким образом, можно предположить конкурентный механизм ингибирования ИН стирилхинолинами за счет взаимодействия с ионом металла в ее активном центре.

Аллостерические ингибиторы

Ингибитор V-165 (рис. 7), относящийся к классу 5H-пирано[2,3-d:-6,5-d']дипириимидинов, предотвращает связывание ИН с ДНК-субстратом. Он более эффективно ингибирует реакцию 3'-процессинга ($IC_{50} = 0.9$ мкМ), чем переноса цепи ($IC_{50} = 16$ мкМ) [93]. Кроме того, V-165 подавляет ВИЧ-инфекцию в культуре клеток [93]. В результате селекции устойчивых к действию ингибитора V-165 штаммов вируса удалось идентифицировать двойную мутацию T206S/S230N в гене ИН [94]. Этот результат подтверждает аллостерический механизм действия V-165, так как мутация находится в С-концевом домене ИН, основная функция которого состоит в связывании ДНК [94].

Ингибиторы мультимеризации интегразы

В настоящее время активно проводится поиск соединений, которые влияют на взаимодействие ИН с компонентами ПИК или на ее собственную способность к образованию активного мультимера [95]. К соединениям, подавляющим мультимеризацию ИН, относятся производные гидроксикумарина. Показано,

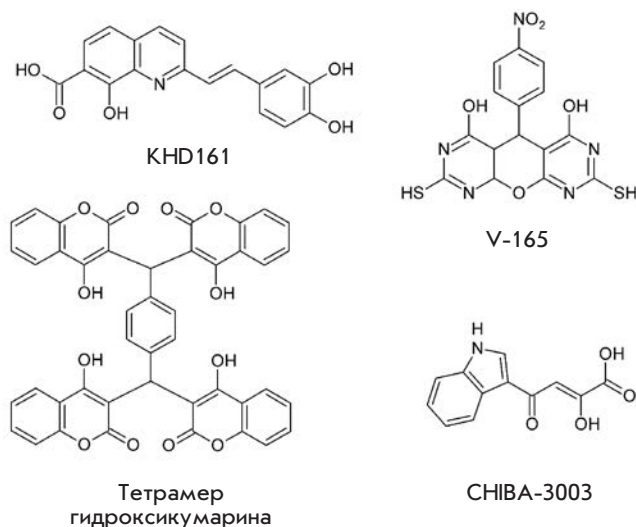


Рис. 7. Структуры KHD161, V-165, тетрамера гидроксикумарина, CHIVA-3003.

что тетрамер гидроксикумарина (рис. 7) подавляет репликацию ВИЧ-1 в культуре клеток со значением $SI_{50} = 11.5$ мкМ [96]. Он способен ингибировать активность интегразы ВИЧ-1 *in vitro*. Тетрамер гидроксикумарина ингибирует 3'-процессинг и перенос цепи ($IC_{50} = 1.5-2.0$ мкМ) [96]. Проведено ковалентное присоединение бензофенонового производного гидроксикумарина к интегразе с тем, чтобы идентифицировать участок связывания ингибитора с ферментом [97]. Определен пептид $^{128}AACWWAGIK^{136}$, к которому присоединялся ингибитор [97]. Этот пептид участвует в образовании димерного комплекса каталитического домена [39]. Таким образом, гидроксикумариновый ингибитор связывается с ферментом вблизи поверхности контакта двух мономеров. Связывание производных гидроксикумарина с ИН в районе пептида $^{128}AACWWAGIK^{136}$ может нарушать подобного рода взаимодействие и влиять на формирование и стабильность каталитически активного мультимера интегразы.

Ингибиторы взаимодействия интегразы с LEDGF/p75

Это наиболее молодое направление поиска ингибиторов интеграции. Несмотря на то что в состав ПИК помимо ИН входит большое количество вирусных и клеточных белков, именно взаимодействие ИН с ее клеточным партнером LEDGF/p75 определяет интеграцию ВИЧ-1 [95]. Информация об ингибиторах, способных разрушать комплекс ИН/LEDGF, весьма ограничена, их активность, как правило, пока невысока. С помощью компьютерного моделирования удалось разработать соединение CHIVA-3003

(рис. 7), способное разрушать комплекс ИН/LEDGF с $IC_{50} = 35$ мкМ [98]. Также было изучено влияние пептида LEDGF³⁵⁵INAEIKNSLKIDNLDVNRNC IEAL³⁷⁷ на стабильность комплекса ИН/LEDGF и каталитическую активность ИН [99]. Оказалось, что этот пептид препятствует образованию комплекса ИН/LEDGF с $IC_{50} = 25$ мкМ, а также ингибирует 3'-процессинг и перенос цепи с $IC_{50} = 160$ мкМ [99].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В 1996 г. расходы, связанные с изучением, лечением и предотвращением распространения ВИЧ/СПИД, составили 300 млн долларов США. С тех пор они постоянно росли и на настоящий момент составляют примерно 10 млрд долларов США в год [18]. Значительная часть этих средств тратится на разработку новых ингибиторов, направленных на подавление вирусных ферментов, в том числе ИН. В течение трех с половиной лет, прошедших после того как ралтегравир разрешили к применению в качестве лекарственного средства против ВИЧ-1, основные усилия

фармацевтических компаний, таких, как «Merck Pharmaceuticals», «Japan Tobacco», «Gilead Sciences», «Shionogi-GlaxoSmithKline Pharmaceuticals», были направлены на разработку аналогов этого препарата. Вместе с тем многие из аналогов ралтегравира неспособны подавлять репликацию штаммов ВИЧ-1, резистентных к ралтегравиру [83, 84]. По нашему мнению, в дальнейшем следует вести более активную разработку ингибиторов с иным механизмом действия, которые могут быть активными по отношению к устойчивым к ралтегравиру штаммам вируса. Однако необходимо отметить, что ни один ингибитор интеграции ВИЧ-1, не относящийся к специфическим ингибиторам переноса цепи, пока не смог успешно пройти даже первую стадию клинических испытаний. ●

*Работа поддержана грантами
РФФИ (№ 11-04-01004_а, 11-04-01586_а),
грантом Президента Российской Федерации
(МК-4821.2011.4), ГК № 16.512.11.2193.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. <http://www.unaids.org/ru>
2. Simon V., Ho D.D., Abdool Karim Q. // Lancet. 2006. V. 368. № 9534. P. 489–504.
3. Turner B.G., Summers M.F. // J. Mol. Biol. 1999. V. 285. P. 1–32.
4. Miller M.D., Farnet C.M., Bushman F.D. // J. Virol. 1997. V. 71. P. 5382–5390.
5. Piller S.C., Caly L., Jans D.A. // Cur. Drug. Targets. 2003. V. 4. № 5. P. 409–429.
6. Li L., Olvera J., Yoder K., Mitchell R.S., Butler S.L., Lieber M., Martin S.L., Bushman F.D. // EMBO J. 2001. V. 20. P. 3272–3281.
7. Farnet C.M., Bushman F.D. // Cell. 1997. V. 88. P. 483–492.
8. Lin C.W., Engelman A. // J. Virol. 2003. V. 77. P. 5030–5036.
9. Vandegraaff N., Devroe E., Turlure F., Silver P.A., Engelman A. // Virology. 2006. V. 346. P. 415–426.
10. Marcelin A.G., Ceccherini-Silberstein F., Perno C.F., Calvez V. // Curr. Opin. HIV AIDS. 2009. V. 4. № 6. P. 531–537.
11. FDA approves raltegravir tablets // AIDS Patient Care STDS. 2007. V. 21. № 11. P. 889.
12. Cara A., Guarnaccia F., Reitz M.S. Jr., Gallo R.C., Lori F. // Virology. 1995. V. 208. P. 242–248.
13. Ramkumar K., Serrao E., Odde S., Neamati N. // Med. Res. Rev. 2010. V. 30. № 5. P. 750–814.
14. Mouscadet J.F., Delelis O., Marcelin A.G., Tchertanov L. // Drug Resist Updat. 2010. V. 13. № 4–5. P. 139–150.
15. De Clercq E. // Curr. Opin. Pharmacol. 2010. V. 10. № 5. P. 507–515.
16. Al-Mawsawi L.Q., Al-Safi R.I., Neamati N. // Expert Opin. Emerg. Drugs. 2008. V. 13. № 2. P. 213–225.
17. Gatell J.M. // Eur. J. Med. Res. 2009. V. 14. P. 30–35.
18. Serrao E., Odde S., Ramkumar K., Neamati N. // Retrovirology. 2009. V. 6. № 25.
19. Приказчикова Т.А., Сычева А.М., Агапкина Ю.Ю., Александров Д.А., Готтих М.Б. // Успехи химии. 2008. Т. 77. № 5. С. 445–459.
20. Агапкина Ю.Ю., Приказчикова Т.А., Смолов М.А., Готтих М.Б. // Усп. биол. хим. 2005. Т. 45. С. 87–122.
21. Delelis O., Carayon K., Saïb A., Deprez E., Mouscadet J.-F. // Retrovirology. 2008. V. 5. P. 114.
22. Poeschla E.M. // Cell Mol. Life Sci. 2008. V. 65. № 9. P. 1403–1424.
23. Zheng R., Jenkins T.M., Craigie R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. № 24. P. 13659–13664.
24. Gallay P., Hope T., Chin D., Trono D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 94. P. 9825–9830.
25. Podtelezhnikov A.A., Gao K., Bushman F.D., McCammon J.A. // Biopolymers. 2003. V. 68. № 1. P. 110–120.
26. Wielens J., Crosby I.T., Chalmers D.K. // J. Comput. Aided Mol. Des. 2005. V. 19. № 5. P. 301–317.
27. Ren G., Gao K., Bushman F.D., Yeager M. // J. Mol. Biol. 2007. V. 366. № 1. P. 286–294.
28. Hare S., Gupta S.S., Valkov E., Engelman A., Cherepanov P. // Nature. 2010. V. 464. № 7286. P. 232–236.
29. Delelis O., Carayon K., Guiot E., Leh H., Tauc P., Brochon J.C., Mouscadet J.-F., Deprez E. // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. № 41. P. 27838–27849.
30. Княжанская Е.С., Смолов М.А., Кондрашина О.В., Готтих М.Б. // Acta Naturae. 2009. Т. 1. № 2 (2). С. 88–91.
31. Sinha S., Pursley M.H., Grandgenett D.P. // J. Virol. 2002. V. 76. P. 3105–3113.
32. van Maele B., Debyser Z. // AIDS Rev. 2005. V. 7. P. 26–43.
33. Yu F., Jones G.S., Hung M., Wagner A.H., MacArthur H.L., Liu X., Leavitt S., McDermott M.J., Tsiang M. // Biochemistry. 2007. V. 46. № 10. P. 2899–2908.
34. 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.
35. Hazuda D.J., Anthony N.J., Gomez R.P., Jolly S.M., Wai J.S., Zhuang L., Fisher T.E., Embrey M., Guare J.P. Jr., Egbertson M.S., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. № 31. P. 11233–11238.

36. Summa V., Petrocchi A., Matassa V.G., Gardelli C., Muraglia E., Rowley M., Paz O.G., Laufer R., Monteagudo E., Pace P. // *J. Med. Chem.* 2006. V. 49. № 23. P. 6646–6649.
37. Guare J.P., Wai J.S., Gomez R.P., Anthony N.J., Jolly S.M., Cortes A.R., Vacca J.P., Felock P.J., Stillmock K.A., Schleif W.A., et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006. V. 16. № 11. P. 2900–2904.
38. Espeseth A.S., Felock P., Wolfe A., Witmer M., Grobler J., Anthony N., Egbertson M., Melamed J.Y., Young S., Hamill T., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. № 21. P. 11244–11249.
39. Goldgur Y., Craigie R., Cohen G.H., Fujiwara T., Yoshinaga T., Fujishita T., Sugimoto H., Endo T., Murai H., Davies D.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. V. 96. № 23. P. 13040–13043.
40. Grobler J.A., Stillmock K., Hu B., Witmer M., Felock P., Espeseth A.S., Wolfe A., Egbertson M., Bourgeois M., Jeffrey Melamed J., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. № 10. P. 6661–6666.
41. Marchand C., Zhang X., Pais G.C.G., Cowansage K., Neamati N., Burke T.R., Pommier Y. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 12596–12603.
42. Billich A. // *Curr. Opin. Investig. Drugs.* 2003. V. 4. № 2. P. 206–209.
43. Zhuang L., Wai J.S., Embrey M.W., Fisher T.E., Egbertson M.S., Payne L.S., Guare J.P. Jr., Vacca J.P., Hazuda D.J., Felock P.J., et al. // *J. Med. Chem.* 2003. V. 46. № 4. P. 453–456.
44. Cotellet P. // *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery.* 2006. V. 1. P. 1–15.
45. Petrocchi A., Koch U., Matassa V.G., Pacini B., Stillmock K.A., Summa V. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2007. V. 17. № 2. P. 350–353.
46. Pace P., Di Francesco M.E., Gardelli C., Harper S., Muraglia E., Nizi E., Orvieto F., Petrocchi A., Poma M., Rowley M., et al. // *J. Med. Chem.* 2007. V. 50. № 9. P. 2225–2239.
47. Gardelli C., Nizi E., Muraglia E., Crescenzi B., Ferrara M., Orvieto F., Pace P., Pescatore G., Poma M., Ferreira Mdel R., et al. // *J. Med. Chem.* 2007. V. 50. № 20. P. 4953–4975.
48. 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.
49. Kassahun K., McIntosh I., Cui D., Hreniuk D., Merschman S., Lasseter K., Azrolan N., Iwamoto M., Wagner J.A., Wenning L.A. // *Drug. Metab. Dispos.* 2007. V. 35. № 9. P. 1657–1663.
50. Iwamoto M., Wenning L.A., Petry A.S., Laethem M., De Smet M., Kost J.T., Merschman S.A., Strohmaier K.M., Ramael S., Lasseter K.C., et al. // *Clin. Pharmacol. Ther.* 2008. V. 83. № 2. P. 293–299.
51. Markowitz M., Morales-Ramirez J.O., Nguyen B.Y., Kovacs C.M., Steigbigel R.T., Cooper D.A., Liporace R., Schwartz R., Isaacs R., Gilde L.R., et al. // *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 2006. V. 43. № 5. P. 509–515.
52. Schafer J.J., Squires K.E. // *Ann. Pharmacother.* 2010. V. 44. № 1. P. 145–156.
53. Ménard A., Solas C., Mokthari S., Bregigeon S., Drogoul M.P., Tamalet C., Lacarelle B., Martin I.P. // *AIDS.* 2009. V. 23. № 7. P. 869–871.
54. Grinsztejn B., Nguyen B.Y., Katlama C., Gatell J.M., Lazzarin A., Vittecoq D., Gonzalez C.J., Chen J., Harvey C.M., Isaacs R.D. // *Lancet.* 2007. V. 369. № 9569. P. 1261–1269.
55. Steigbigel R.T., Cooper D.A., Tepler H., Eron J.J., Gatell J.M., Kumar P.N., Rockstroh J.K., Schechter M., Katlama C., Markowitz M., et al. // *Clin. Infect. Dis.* 2010. V. 50. № 4. P. 605–612.
56. Markowitz M., Nguyen B.Y., Gotuzzo E., Mendo F., Ratanasuwana W., Kovacs C., Prada G., Morales-Ramirez J.O., Crumacker C.S., Isaacs R.D., et al. // *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 2007. V. 46. № 2. P. 125–133.
57. Lennox J.L., DeJesus E., Lazzarin A., Pollard R.B., Madruga J.V., Berger D.S., Zhao J., Xu X., Williams-Diaz A., Rodgers A.J., et al. // *Lancet.* 2009. V. 374. № 9692. P. 796–806.
58. Towner W., Klein D., Kerrigan H.L., Follansbee S., Yu K., Horberg M. // *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 2009. V. 51. № 4. P. 367–373.
59. FDA notifications. Raltegravir indication extended for treatment-naive patients // *AIDS Alert.* 2009. V. 24. № 8. P. 93.
60. Cooper D.A., Steigbigel R.T., Gatell J.M., Rockstroh J.K., Katlama C., Yeni P., Lazzarin A., Clotet B., Kumar P.N., Eron J.E., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2008. V. 359. № 4. P. 355–365.
61. Malet I., Delelis O., Valantin M.A., Montes B., Soulie C., Wirlden M., Tchertanov L., Peytavin G., Reynes J., Mouscadet J.-F., et al. // *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2008. V. 52. № 4. P. 1351–1358.
62. Delelis O., Malet I., Na L., Tchertanov L., Calvez V., Marcelin A.G., Subra F., Deprez E., Mouscadet J.-F. // *Nucleic. Acids Res.* 2009. V. 37. № 4. P. 1193–1201.
63. Wiscount C.M., Williams P.D., Tran L.O., Embrey M.W., Fisher T.E., Sherman V., Homnick C.F., Donnette Staas D., Lyle T.A., Wai J.S., et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008. V. 18. № 16. P. 4581–4583.
64. Di Francesco M.E., Pace P., Fiore F., Naimo F., Bonelli F., Rowley M., Summa V. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008. V. 18. № 8. P. 2709–2713.
65. Wai J.S., Kim B., Fisher T.E., Zhuang L., Embrey M.W., Williams P.D., Staas D.D., Culbertson C., Lyle T.A., Vacca J.P., et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2007. V. 17. № 20. P. 5595–5599.
66. Muraglia E., Kinzel O., Gardelli C., Crescenzi B., Donghi M., Ferrara M., Nizi E., Orvieto F., Pescatore G., Laufer R., et al. // *J. Med. Chem.* 2008. V. 51. № 4. P. 861–874.
67. Jin H., Wright M., Pastor R., Mish M., Metobo S., Jabri S., Lansdown R., Cai R., Pyun P., Tsiang M., et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008. V. 18. № 4. P. 1388–1391.
68. Garvey E.P., Johns B.A., Gartland M.J., Foster S.A., Miller W.H., Ferris R.G., Hazen R.J., Underwood M.R., Boros E.E., Thompson J.B., et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008. V. 52. № 3. P. 901–908.
69. Reddy Y.S., Min S.S., Borland J., Song I., Lin J., Palleja S., Symonds W.T. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007. V. 51. № 12. P. 4284–4289.
70. Min S., Song I., Borland J., Chen S., Lou Y., Fujiwara T., Piscitelli S.C. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010. V. 54. № 1. P. 254–258.
71. Vandekerckhove L. // *Curr. Opin. Invest. Drugs.* 2010. V. 11. P. 203–212.
72. Sato M., Motomura T., Aramaki H., Matsuda T., Yamashita M., Ito Y., Kawakami H., Matsuzaki Y., Watanabe W., Yamataka K., et al. // *J. Med. Chem.* 2006. V. 49. № 5. P. 1506–1508.
73. Sato M., Kawakami H., Motomura T., Aramaki H., Matsuda T., Yamashita M., Ito Y., Matsuzaki Y., Yamataka K., Ikeda S., et al. // *J. Med. Chem.* 2009. V. 52. № 15. P. 4869–4882.
74. Correll T., Klibanov O.M. // *Pharmacotherapy.* 2008. V. 28. № 1. P. 90–101.
75. DeJesus E., Berger D., Markowitz M., Cohen C., Hawkins T., Ruane P., Elion R., Farthing C., Zhong L., Cheng A.K., et al. // *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 2006. V. 43. № 1. P. 1–5.
76. Zolopa A.R., Berger D.S., Lampiris H., Zhong L., Chuck S.L., Enejosa J.V., Kearney B.P., Cheng A.K. // *J. Infect. Dis.* 2010. V. 201. № 6. P. 814–822.

77. Cohen C., Elion R., Ruane P., Shamblaw D., DeJesus E., Raschbaum B., Chuck S.L., Yale K., Liu H.C., Warren D.R., et al. // *AIDS*. 2011. V. 25. № 6. P. F7–F12.
78. McColl D.J., Fransen S., Gupta S., Parkin N., Margot N., Chuck S., Cheng A.K., Miller M.D. // *Antivir. Ther.* 2007. V. 12. P. S11–S111.
79. Ceccherini-Silberstein F., Malet I., D'Arrigo R., Antinori A., Marcelin A.G., Perno C.F. // *AIDS Rev.* 2009. V. 11. № 1. P. 17–29.
80. Goethals O., Clayton R., van Ginderen M., Vereycken I., Wagemans E., Geluykens P., Dockx K., Strijbos R., Smits V., Vos A., et al. // *J. Virol.* 2008. V. 82. № 21. P. 10366–10374.
81. Langley D.R., Samanta H.K., Lin Z., Walker M.A., Krystal M.R., Dicker I.B. // *Biochemistry*. 2008. V. 47. P. 13481–13488.
82. Marinello J., Marchand C., Mott B.T., Bain A., Thomas C.J., Pommier Y. // *Biochemistry*. 2008. V. 47. № 36. P. 9345–9354.
83. Kobayashi M., Nakahara K., Seki T., Miki S., Kawauchi S., Suyama A., Wakasa-Morimoto C., Kodama M., Endoh T., Oosugi E., et al. // *Antiviral Res.* 2008. V. 80. № 2. P. 213–222.
84. Nakahara K., Wakasa-Morimoto C., Kobayashi M., Miki S., Noshi T., Seki T., Kanamori-Koyama M., Kawauchi S., Suyama A., Fujishita T., et al. // *Antiviral Res.* 2009. V. 81. № 2. P. 141–146.
85. an Baelen K., van Eygen V., Rondelez E., Stuyver L.J. // *AIDS*. 2008. V. 22. P. 1877–1880.
86. Bar-Magen T., Donahue D.A., McDonough E.I. // *AIDS*. 2010. V. 24. № 14. P. 2171–2179.
87. Maiga A.I., Malet I., Soulie C., Derache A., Koita V., Amellal B., Tchertanov L., Delelis O., Morand-Joubert L., Mouscadet J.-F., et al. // *Antivir. Ther.* 2009. V. 14. P. 123–129.
88. Sichtig N., Sierra S., Kaiser R., Daumer M., Reuter S., Schalter E., Altmann A., Fatkenheuer G., Dittmer U., Pfister H., et al. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2009. V. 64. P. 25–32.
89. Mekouar K., Mouscadet J.-F., Desmaële D., Subra F., Leh H., Savoure D., Auclair C., d'Angelo J. // *J. Med. Chem.* 1998. V. 41. P. 2846–2857.
90. Ouali M., Laboulais C., Leh H., Gill D., Desmaele D., Mekouar K., Zouhiri F., d'Angelo J., Auclair C., Mouscadet J.-F., et al. // *J. Med. Chem.* 2000. V. 43. № 10. P. 1949–1957.
91. Zouhiri F., Mouscadet J.-F., Khalid Mekouar K., Desmaële D., Savouré D., Leh H., Subra F., Le Bret M., Auclair C., d'Angelo J. // *J. Med. Chem.* 2000. V. 43. P. 1533–1540.
92. Deprez E., Barbe S., Kolaski M., Leh H., Zouhiri F., Auclair C., Brochon J.-C., Le Bret M., Mouscadet J.-F. // *Mol. Pharmacol.* 2004. V. 65. № 1. P. 85–98.
93. Pannecouque C., Pluymers W., van Maele B., Tetz V., Cherepanov P., De Clercq E., Witvrouw M., Debyser Z. // *Curr. Biol.* 2002. V. 12. № 14. P. 1169–1177.
94. Hombrouck A., Hantson A., van Remoortel B., Michiels M., Vercammen J., Rhodes D., Tetz V., Engelborghs Y., Christ F., Debyser Z., et al. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2007. V. 59. № 6. P. 1084–1095.
95. Al-Mawsawi L.Q., Neamati N. // *Trends Pharmacol. Sci.* 2007. V. 28. № 10. P. 526–535.
96. Mazumder A., Wang S., Neamati N., Nicklaus M., Sunder S., Chen J., Milne G.W.A., Rice W.G., Burke T.R. Jr., Pommier Y. // *J. Med. Chem.* 1996. V. 39. P. 2472–2481.
97. Al-Mawsawi L.Q., Fikkert V., Dayam R., Witvrouw M., Burke T.R. Jr., Borchers C.H., Neamati N. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. № 26. P. 10080–10085.
98. De Luca L., Barreca M.L., Ferro S., Christ F., Iraci N., Gitto R., Monforte A.M., Debyser Z., Chimirri A. // *Chem. Med. Chem.* 2009. V. 4. № 8. P. 1311–1316.
99. Al-Mawsawi L.Q., Christ F., Dayam R., Debyser Z., Neamati N. // *FEBS Lett.* 2008. V. 582. № 10. P. 1425–1430.

УДК 577.2

Подавление экспрессии генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC* с помощью siРНК снижает скорость пролиферации клеток нейробластомы человека на длительное время

И. А. Акимов, Е. Л. Черноловская*, Ю. Е. Спицына, Е. И. Рябчикова, М. А. Зенкова
 Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения
 Российской академии наук, 630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8
 *E-mail: elena_ch@niboch.nsc.ru
 Поступила в редакцию 15.04.2011 г.

РЕФЕРАТ Изменение экспрессии генов, продукты которых участвуют в регуляции клеточного цикла, влияет на процессы клеточной дифференцировки и апоптоза, может привести к неконтролируемой пролиферации клеток и соответственно к развитию злокачественных опухолей. В данной работе изучено влияние подавления экспрессии генов-регуляторов клеточного цикла с помощью малых интерферирующих РНК (siРНК), направленных на участки мРНК генов *Her2*, циклина В1 (*CCNB1*) и протеинкиназы С (*PKC*), на пролиферацию опухолевых клеток человека различного происхождения. Максимальное подавление экспрессии генов *CCNB1*, *Her2* (в клетках KB-3-1, SK-N-MC, MCF-7) и *PKC* (в клетках MCF-7) наблюдается через 72 ч после трансфекции соответствующей siРНК, а через 12 дней после трансфекции происходит полное восстановление исходного уровня экспрессии генов-мишеней. Ингибирование экспрессии генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC* по-разному снижает скорость пролиферации клеточных линий. Антипролиферативное действие использованных siРНК наиболее выражено в клетках нейробластомы SK-N-MC, 3–10-кратное снижение скорости пролиферации которых наблюдается даже после восстановления исходных уровней экспрессии генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC*. Результаты нашей работы свидетельствуют о том, что гены *CCNB1* и *PKC* могут служить мишенями для разрабатываемых ген-направленных препаратов, эффективных против нейробластомы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА нейробластома, siРНК, *Her2*, *CCNB1*, *PKC*, пролиферация.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ C – 2'-О-метилцитозин; U – 2'-О-метилуридин; siРНК (small interfering RNA) – малые интерферирующие РНК; МТТ – 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолбромид; PBS – фосфатно-солевой буфер; FBS – эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота.

ВВЕДЕНИЕ

Злокачественная трансформация клеток – сложный процесс, включающий как генетические нарушения, так и сбой в регуляции процессов дифференцировки, апоптоза и пролиферации [1, 2]. Цепь передачи регуляторных сигналов в клетке имеет каскадный характер и состоит из многих путей, дублирующих друг друга [3]. При подавлении экспрессии одного из участвующих в передаче сигналов клеточных факторов возможна компенсация его функции за счет активации альтернативных сигнальных путей [3]. Это обстоятельство, с одной стороны, осложняет поиск адекватных молекулярных мишеней, а с другой, определяет необходимость создания противоопухолевых средств, обеспечивающих необратимый антипролиферативный эффект путем «выключения»

синтеза белковых факторов, локализованных на пересечении регуляторных путей.

Причиной неконтролируемого деления клеток при онкологических заболеваниях может быть гиперэкспрессия нормальных генов или экспрессия их мутантных вариантов, кодирующих факторы транскрипции, рецепторы, тирозинкиназы и другие регуляторные белки [2]. Подавление синтеза таких белков может дать положительный результат и нормализовать пролиферацию клеток [4–7].

В настоящее время РНК-интерференция широко используется как для изучения роли генов в регуляции клеточного цикла, так и для выявления потенциальных мишеней для создания новых терапевтических средств [8–10]. Специфичное и эффективное подавление экспрессии генов-мишеней может быть

достигнуто с помощью химически синтезированных малых интерферирующих РНК (siРНК) [11]. Продукты генов *Her2*, циклина В1 (*CCNB1*) и протеинкиназы С (*PKC*) относятся к разным группам белков, участвующих в регуляции клеточного цикла [8, 12, 13]. Ранее было показано экспериментально и подтверждено клинически, что нарушения экспрессии этих генов могут приводить к возникновению злокачественных опухолей у человека [12, 14–18]. Уровень амплификации и экспрессии этих генов в клетках рака молочной железы, яичников и других органов человека значительно выше, чем в нормальных клетках этих органов [14, 17–32]. Более того, высокие уровни экспрессии генов *Her2*, *CCNB1*, *PKC* коррелируют с плохим прогнозом: снижается 3-летняя выживаемость и продолжительность безрецидивного периода [17, 18, 22–25, 30].

Ген *Her2* (известный также, как *c-erb-B2* и *neu*) кодирует трансмембранный гликопротеин, который обладает тирозинкиназной активностью и относится к семейству рецепторов эпидермального фактора роста человека, играющих важную роль в контроле пролиферации, дифференцировки и подвижности эпителиальных клеток человека [33, 34]. Уровень экспрессии гена *Her2*, значительно превышающий норму, обнаружен в клетках рака молочной железы, эндометрия, шейки матки, яичников, фаллопиевых труб и легкого человека [25, 29, 30].

Циклин В1, кодируемый геном *CCNB1*, является регуляторной субъединицей комплекса циклин-зависимой киназы 1 (CDK1), контролирующего переход из фазы G₂ клеточного цикла в фазу М [35]. Гиперэкспрессия гена *CCNB1* обычно не сразу приводит к нарушению клеточного цикла, что обуславливает накопление в клетке мутаций [36]. Повышенный уровень экспрессии этого гена, характерный для добро- и злокачественных опухолей предстательной железы человека [37], часто является причиной анеуплоидии [38]. Очевидно, нарушение экспрессии гена *CCNB1* можно рассматривать как раннее событие в злокачественном перерождении клеток [17].

Протеинкиназа С, кодируемая геном *PKC*, экспрессируется во многих тканях и органах человека, она играет важную роль в передаче регуляторных сигналов, активирующих различные клеточные функции, в том числе и пролиферацию [39, 40]. Превышающий норму уровень экспрессии гена *PKC* обнаружен в человеческих раковых клетках различного происхождения [18, 19].

Известно, что подавление экспрессии одного и того же гена в опухолевых клетках различного тканевого происхождения может приводить к различному антипролиферативному эффекту [41]. Это определяет необходимость сравнения антипролиферативного дей-

ствия siРНК в разных линиях опухолевых клеток человека. Ранее мы показали, что siРНК, направленные на мРНК генов *Her2*, *CCNB1*, *PKC*, эффективно ингибируют экспрессию целевых генов и в течение 5 дней после трансфекции оказывают антипролиферативное действие на опухолевые клетки человека [41].

В настоящей работе мы оценили отдаленные последствия кратковременного подавления экспрессии генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC* для пролиферации и морфологии опухолевых клеток человека. Мы показали, что siРНК, гомологичные мРНК генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC*, подавляют экспрессию этих генов с достижением максимального эффекта (до 4–22% от уровня в контроле) через 72 ч после трансфекции. Эти siРНК с разной эффективностью замедляли деление опухолевых клеток человека различного тканевого происхождения. Мы обнаружили, что в клетках нейробластомы SK-N-MC антипролиферативный эффект siCyc и siPKC сохраняется даже после восстановления исходных уровней экспрессии генов-мишеней. Полученные данные позволяют предположить, что гены *CCNB1* и *PKC* играют ключевую роль в поддержании высокой скорости пролиферации клеток нейробластомы, а их кратковременное подавление приводит к переключению путей передачи сигналов и нормализации скорости деления клеток. Таким образом, гены *CCNB1* и *PKC* в клетках SK-N-MC могут служить потенциальными эффективными мишенями для средств, направленных против нейробластомы, включая siРНК.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

siРНК

Все олигорибонуклеотиды, использованные для формирования siРНК-дуплексов, синтезировали в Лаборатории химии РНК ИХБФМ СО РАН твердофазным фосфитамидным методом на автоматическом синтезаторе ASM-102U («Биоссет», Россия) и выделяли с помощью высокоэффективной обращенно-фазовой хроматографии. Нуклеозочувствительные сайты siРНК защищали, вводя в siРНК 2'-О-Ме-аналоги рибонуклеотидов, с помощью алгоритма, описанного ранее [42, 43]. Чистота олигорибонуклеотидов была не менее 95% по данным электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. В работе использовали следующие siРНК: siHer, гомологичную участку 1297–1317 мРНК гена *Her2* человека (смысловая цепь 5'-GCAGUUACCAGUGCCAAUAAUU-3', антисмысловая цепь 5'-UAUUGGCACUGGUAACUGCCC-3'); siCyc, гомологичную участку 189–209 мРНК гена *CCNB1* человека (смысловая цепь 5'-CACCAGGAACUCGAAAAUUUU-3', антисмыс-

ловая цепь 5'-AAUUUUCGAGUCCUGGUGAC-3'); siPKC, гомологичную участку 1079-1099 мРНК гена PKC человека (смысловая цепь 5'-GCCGCCAGAGAAGGAAAAUU-3', антисмысловая цепь 5'-UUUUUCCUUCUCUGGCCCGCUG-3'), подчеркнуты 2'-О-Ме-модифицированные звенья. В качестве отрицательного контроля использовали siScr (смысловая цепь 5'-CAAGUCUCGU AUGUAGUGGUU-3', антисмысловая цепь 5'-CCACUACAUCGAGACUUGUU-3'), не имеющую значимой гомологии с нуклеотидными последовательностями мРНК генов мыши, крысы и человека. siРНК подбирали с использованием программы BioPredSi [44]. siРНК получали путем гибридизации антисмысловой и смысловой цепей в буфере 15 мМ HEPES-КОН pH 7.4, 50 мМ ацетат калия, 1 мМ ацетат магния. Для этого эквимольную смесь олигорибонуклеотидов (смысловая и антисмысловая цепи) инкубировали в течение 2 мин при 90°C и медленно охлаждали до комнатной температуры.

Клеточные культуры и трансфекция siРНК

Линии клеток карциномы шейки матки человека KB-3-1, нейробластомы SK-N-MC и аденокарциномы молочной железы MCF-7 получены из коллекции Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Клетки растили в среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (FBS), 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 0.25 мкг/мл амфотерицина, при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂. За сутки до опыта клетки, находящиеся в фазе экспоненциального роста, рассеивали на 6-луночные планшеты: KB-3-1 – по 4 × 10⁴, SK-N-MC – 2 × 10⁵, MCF-7 – 8 × 10⁴ клеток/лунку, либо на 24-луночные планшеты KB-3-1 – по 10⁵, SK-N-MC – 1.25 × 10⁵ и MCF-7 – 1.5 × 10⁵ клеток/лунку и оставляли прикрепляться в течение ночи. Клетки трансфицировали siРНК в концентрации 200 нМ, используя в качестве трансфектанта Липофектамин 2000™ («Invitrogen», США), а для клеток SK-N-MC – Олигофектамин™ («Invitrogen», США) в соответствии с протоколом производителя. Уровни специфических мРНК определяли через 1–5, 7, 10 и 12 сут после трансфекции. Клетки, обработанные только трансфицирующим агентом или комплексом siScr/липофектамин (олигофектамин), служили контролем. В процессе опыта клетки пересевали раз в 3–4 дня для поддержания экспоненциального роста.

Обратная транскрипция и ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР)

Суммарную РНК выделяли из клеток, используя SDS-фенольный метод [45]. Реакцию обратной транс-

крипции (ОТ) проводили в смеси объемом 20 мкл, содержащей 1 мкг суммарной РНК, 5 мкМ олиго(dT₁₅)-праймера, 50 мМ Трис-НСl, pH 8.3, 75 мМ КСl, 3 мМ MgCl₂, 0.5 мМ dNTP, 5 мМ дитиотреитола и 10 ед. акт. обратной транскриптазы MMLV (вирус лейкоза мышей Молони). Реакционную смесь инкубировали при 42°C в течение 1 ч. Полученную кДНК амплифицировали в реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащей 1 мкл кДНК, 10 мМ Трис-НСl, pH 8.3, 50 мМ КСl, 1.5 мМ MgCl₂, 0.01% Твин-20, по 0.25 мМ каждого dNTP, по 0.25 мкМ каждого праймера, 0.5 мМ EvaGreen («Biotium», США) и 2 ед. акт. термостабильной ДНК-полимеразы *Thermus aquaticus* (производство ИХБФМ СО РАН). ПЦР в реальном времени проводили на приборе Bio-Rad iQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection System по следующей схеме: один цикл – 3 мин, 95°C, 40 циклов – 30 с, 95°C, 30 с – 58°C, 30 с – 72°C. Количество мРНК каждого гена нормировали на количество мРНК β-актина, поскольку уровень экспрессии этого гена относительно постоянный в клетках различного типа. Относительный уровень экспрессии генов определяли с помощью программы Bio-Rad iQ5 2.0 («Bio-Rad Laboratories Inc.», США).

В работе использовали следующие ДНК-праймеры:

Her2 прямой – 5'-AGCAATGGTGTCTCAGTATCCAG-GCT-3',

Her2 обратный – 5'-TGCAAATGGACAAAGTGGGT-GTGG-3',

CCNB1 прямой – 5'-AGGAAGAGCAAGCAGTCA-GACCAA-3',

CCNB1 обратный – 5'-GCAGCATCTTCTTGGGCA-CACAAT-3',

PKC прямой – 5'-GCTGTCTTTTCACGATGCCCC-3',

PKC обратный – 5'-CACCCGACGACCCTGAGA-GA-3',

β-актин прямой – 5'-ACCAACTGGGACGACATG-GAGAAA-3',

β-актин обратный – 5'-ТТААТГТСАГСАС-GATTTCCCGC-3'.

МТТ-тест

Число живых клеток определяли, используя колориметрический метод, основанный на окислении 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолбромидом (МТТ) в митохондриях живых клеток [46]. Клетки на 6-й день после трансфекции siРНК рассеивали с 6-луночного на 96-луночные планшеты при плотности KB-3-1 – 1.5 × 10³, SK-N-MC – 7.5 × 10³, MCF-7 – 3 × 10³ клеток/лунку (в объеме среды 100 мкл/лунку) и вновь инкубировали в течение от 1 до 6 сут при 37°C. Затем к клеткам добавляли раствор МТТ до концентрации

0.5 мг/мл. Через 3 ч культуральную среду удаляли, образовавшиеся кристаллы формазана растворяли в диметилсульфоксиде (100 мкл/лунку) и измеряли оптическую плотность раствора на многоканальном фотометре Multiscan RC («Labsystems») на длинах волн 570 и 630 нм. Результаты представляли как относительную скорость пролиферации, т.е. скорость деления клеток в образце, нормированную на скорость деления клеток в контроле (принятую за 100%). Скорость пролиферации вычисляли по формуле: $V = (D_{12} - D_7)/(\Delta t)$, где D_{12} и D_7 – оптическая плотность в лунках соответственно через 12 и 7 сут после трансфекции, Δt – интервал времени наблюдения за клетками (т.е. $12 - 7 = 5$ сут).

Микроскопический анализ

Для микроскопического анализа клетки нейробластомы SK-N-MC через 48 ч после трансфекции препаратами siРНК рассеивали на круглые покровные стекла диаметром 15 мм, помещенные в лунки 24-луночного планшета, по 10^5 клеток/лунку. Клетки, обработанные только олигофектамином, интактные клетки и клетки, трансфицированные siScr (контроли), инкубировали в течение 24, 48 и 72 ч; а клетки, трансфицированные siРНК siCyc, siPKC – в течение 3, 5, 7 и 12 сут. После инкубации клетки промывали 0.5 мл DMEM и фиксировали, не снимая со стекла, 4% параформальдегидом в среде DMEM. Затем препараты клеток промывали PBS, обрабатывали в течение 5 мин ацетоном, вновь промывали PBS, окрашивали гематоксилином или по Фельгену [47], заключали в полистирол. Окрашенные препараты клеток нейробластомы SK-N-MC изучали в световом микроскопе DM2500 с цифровой камерой DFC420 («Leica», Германия). Подсчет митозов проводили при увеличении объектива $\times 40$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Гены *Her2*, *CCNB1* и *PKC*, кодирующие важнейшие регуляторные белки клеточного цикла, были выбраны в качестве мишеней для siРНК, поскольку их гиперэкспрессия часто ассоциирована с возникновением различных опухолевых заболеваний.

Анализ уровней экспрессии генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC* в клетках линий KB-3-1, SK-N-MC и MCF-7 после трансфекции соответствующими siРНК

Экспрессию целевых генов определяли в клетках линий KB-3-1 (карцинома шейки матки), SK-N-MC (нейробластома) и MCF-7 (аденокарцинома молочной железы). В этих клеточных линиях ранее нами был обнаружен высокий уровень мРНК гена *CCNB1*, несколько меньший уровень мРНК гена *Her2*, а повышенный уровень мРНК гена *PKC* выявлен только в клетках MCF-7 [41].

Действие siРНК на экспрессию целевых генов анализировали по следующей схеме: siРНК в концентрации 200 нМ трансфицировали в клетки, используя в качестве трансфектантов ОлигофектаминTM (SK-N-MC) и Липофектамин 2000TM (другие клеточные линии). Через 1–12 дней после трансфекции (контрольные клетки при длительных экспериментах пересевали каждые 3–4 дня) из клеток выделяли суммарную РНК и определяли уровень специфических мРНК с помощью ПЦР в реальном времени, используя ген β -актина в качестве внутреннего стандарта. Специфичность действия siРНК проверяли по сохранению уровней мРНК β -актина и негомологичных генов-мишеней (рис. 1).

Как видно из рис. 1, все siРНК эффективно и специфично подавляют экспрессию своих генов-мишеней в использованных клеточных линиях, причем максимальное подавление (вплоть до 97–99%) наблюдается через 72 ч после трансфекции. siHer снижала экспрессию только гена *Her2*, но не влияла на экспрессию генов *CCNB1*, *PKC* и β -актина; аналогичные результаты получены и при использовании siРНК siCyc и siPKC. siРНК произвольной последовательности (siScr) также не изменяла уровни экспрессии генов-мишеней.

siHer и siCyc снижали уровни мРНК генов *Her2* и *CCNB1* в клетках всех использованных линий. Через 72 ч после трансфекции уровень мРНК гена *Her2* составил 15% в клетках KB-3-1, 4% в клетках SK-N-MC и 7% – в клетках линии MCF-7 относительно контроля. Уровень мРНК гена *CCNB1* в клетках KB-3-1 через 72 ч после трансфекции siCyc снижался до 22% по сравнению с контролем, до 16% – в SK-N-MC и до 18% – в клетках MCF-7. Трансфекция siPKC снижает уровень мРНК гена *PKC* в клетках MCF-7 до 14% (рис. 1). Полученные данные свидетельствуют о том, что siHer, как ингибитор экспрессии гена *Her2*, наиболее эффективен в клетках линий SK-N-MC и MCF-7, а siCyc наиболее существенно снижает уровень мРНК гена *CCNB1* в клетках SK-N-MC и MCF-7 (рис. 1). Начиная с 4-го дня после трансфекции уровень мРНК всех генов постепенно увеличивался и возвращался к исходному значению к 7–12 сут после трансфекции (рис. 1).

Как видно из рис. 1, кинетические кривые относительного уровня мРНК генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC* после трансфекции специфическими siРНК носят U-образный характер. Визуально в каждой кривой можно выделить участок снижения уровня специфической мРНК (1–3 день), участок возрастания ее количества (3–7 день) и участок, на котором количество мРНК-мишени стабилизируется на уровне, соответствующем уровню в контрольных клетках (7–12 день). Постепенное восстановление исходного уровня

Таблица 1. Действие siРНК на пролиферацию клеток KB-3-1, SK-N-MC, MCF-7

siРНК, 200 нМ	Скорость пролиферации*, %		
	KB-3-1	SK-N-MC	MCF-7
Контроль**	100 ± 7	100 ± 6	100 ± 3
siScr	113 ± 10	90 ± 7	93 ± 6
siHer	123 ± 8	36 ± 9	78 ± 2
siCyc	112 ± 9	14 ± 4	73 ± 2
siPKC	117 ± 14	9 ± 3	79 ± 2

*Представлены средние значения по результатам трех независимых опытов ± стандартное отклонение.

**Клетки, обработанные только трансфектантом.

мРНК в клетках связано, вероятно, с клеточным делением, которое приводит к снижению концентрации siРНК в цитоплазме и, как следствие, к ослаблению эффекта РНК-интерференции.

Таким образом, использованные siРНК обеспечивают эффективное подавление экспрессии генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC* в опухолевых клетках человека, а анализ их экспрессии на уровне мРНК доказал специфичность действия выбранных siРНК.

Пролиферация клеток линий KB-3-1, SK-N-MC и MCF-7 после восстановления исходного уровня экспрессии генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC*

Ранее нами было показано, что наблюдаемый антипролиферативный эффект исследуемых siРНК обусловлен замедлением деления клеток, а не их гибелью [41]. В настоящей работе мы анализировали изменения скорости пролиферации клеток после восстановления исходного уровня экспрессии генов-мишеней. Зависимость скорости пролиферации клеток KB-3-1, SK-N-MC и MCF-7 от уровня экспрессии генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC* оценивали с помощью МТТ-теста в период с 7 по 12 день после трансфекции соответствующей siРНК (200 нМ), принимая скорость пролиферации клеток в контрольных образцах за 100% (табл. 1). Как и ожидалось, трансфекция неспецифической siScr не приводит к достоверному изменению скорости пролиферации клеток.

Скорость пролиферации клеток линии KB-3-1 после восстановления исходных уровней экспрессии генов-мишеней (*Her2*, *CCNB1*) практически не отличается от скорости пролиферации контрольных клеток. Напротив, скорость пролиферации клеток SK-N-MC и MCF-7 оставалась сниженной даже после восстановления экспрессии генов-мишеней (*Her2*, *CCNB1*). Так, после трансфекции siHer скорость деления клеток SK-N-MC и MCF-7 в промежутке 7–12 сут составляла 36 и 78% от уровня в контроле соот-

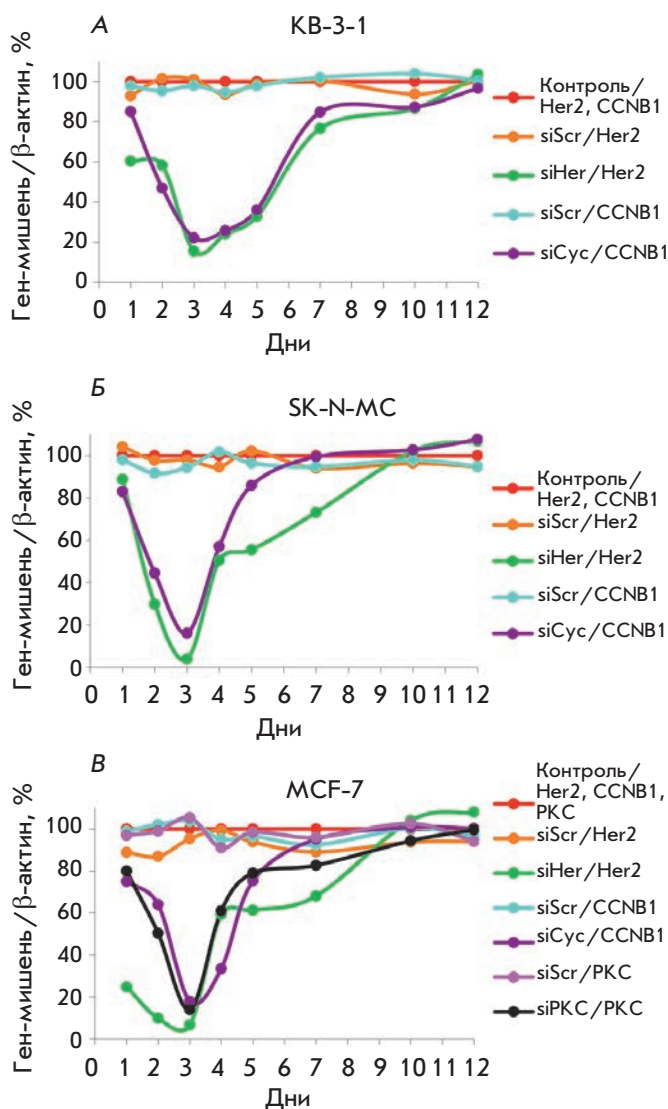
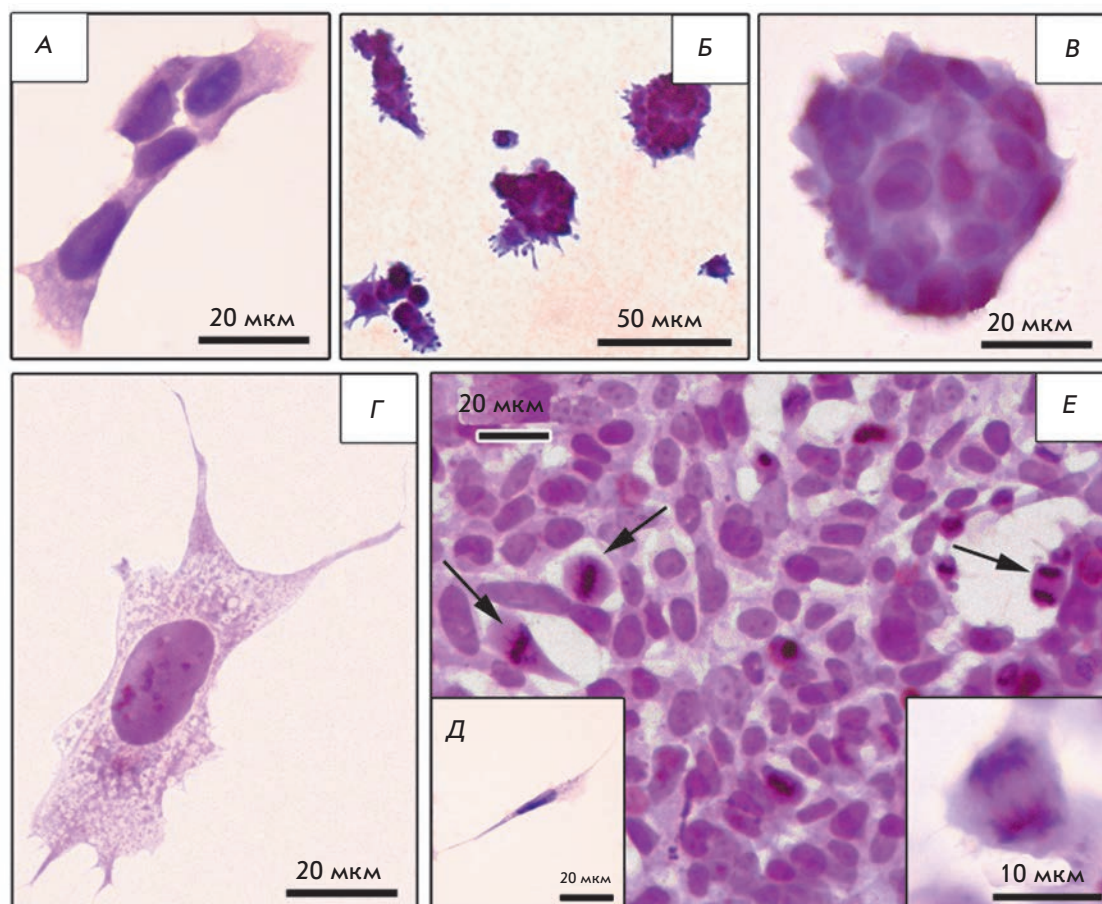


Рис. 1. Относительный уровень мРНК генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC* в клетках KB-3-1 (А), SK-N-MC (Б) и MCF-7 (В) через 1–12 сут после трансфекции соответствующими siРНК (200 нМ). Уровень мРНК β-актина использовали в качестве внутреннего стандарта. Данные суммированы по результатам трех независимых экспериментов. Стандартное отклонение (SD) не превышает 10%. Контроль/гены – относительный уровень мРНК генов в контрольных клетках. siРНК/ген(ы) – относительный уровень мРНК ген(ов) в клетках после трансфекции соответствующей siРНК.

ветственно. Скорость пролиферации клеток SK-N-MC и MCF-7, экспонированных к действию siCyc, оставалась на уровне 14 и 73% от уровня в контроле соответственно, а siPKC – 9 и 79% (табл. 1). Следует отметить, что siPKC оказывает наиболее выраженное и длительное антипролиферативное действие (10-кратное замедление скорости деления) на клет-

Рис. 2. Морфология клеток нейробластомы SK-N-MC на стекле (тотальные препараты). А – «островные» клетки; Б, В – плотные шаровидные скопления клеток; Г – нейроноподобная клетка; Д – веретеновидная клетка; Е – митозы (показаны стрелками) в клетках культуры через 5 сут после трансфекции siСус (200 нМ); на врезке показано расхождение митотических хромосом. Окраска гематоксилином.



ки нейробластомы SK-N-MC, в которых экспрессия гена *PKC* не выявляется используемыми методами (см. [41]). siHer и siСус также оказывали наиболее выраженное антипролиферативное действие на клетки линии SK-N-MC. Таким образом, специфическое подавление экспрессии генов, отвечающих за регуляцию клеточного цикла, способно существенно замедлять и даже останавливать деление клеток SK-N-MC.

Как видно из *табл. 1*, использованные клеточные линии можно условно разделить на три группы: клетки, скорость пролиферации которых полностью восстанавливается (KB-3-1); скорость пролиферации которых остается значительно сниженной (SK-N-MC); и клетки, скорость пролиферации которых остается сниженной, но незначительно, после восстановления исходного уровня мРНК генов-мишеней. Вероятно, временное подавление экспрессии генов *Her2*, *CCNB1*, *PKC* не приводит к необратимым изменениям в путях регуляции деления клеток KB-3-1, поэтому при восстановлении уровней мРНК этих генов восстанавливается и скорость пролиферации клеток. Иначе обстоит дело с клетками SK-N-MC: временное подавление экспрессии этих генов приво-

дит, по-видимому, к необратимым изменениям в путях регуляции пролиферации, поэтому скорость пролиферации остается значительно сниженной даже после восстановления уровней мРНК генов-мишеней. В клетках MCF-7 подавление пролиферации носит промежуточный характер, скорость деления восстанавливается, но не полностью. Это, вероятно, указывает на то, что в данных клеточных линиях гены *Her2*, *CCNB1*, *PKC* играют не одинаковую по важности роль в путях регуляции пролиферации.

Полученные результаты свидетельствуют, что в клетках нейробластомы SK-N-MC наиболее эффективной мишенью для ген-направленного воздействия является ген *PKC*, а в клетках рака молочной железы MCF-7 – *CCNB1*. В клетках SK-N-MC антипролиферативный эффект ингибирования экспрессии генов *CCNB1* и *PKC* существенно выше эффекта, обусловленного siHer (*табл. 1*).

Влияние ингибирования экспрессии генов *CCNB1* и *PKC* на морфологические характеристики культуры клеток SK-N-MC

Проведенное исследование показало, что наиболее эффективное ингибирование экспрессии генов

CCNB1 и PKC наблюдается в культуре клеток SK-N-MC нейробластомы человека (табл. 1), поэтому мы провели микроскопическое изучение изменений морфологии и деления клеток этой линии под действием siCyc и siPKC.

Культура клеток нейробластомы SK-N-MC, обработанная ОлигофактаминоTM (контроль), через 24 ч инкубации представлена разными типами клеток (рис. 2). Часть клеток образует на стекле монослой с «островами роста», другая часть формирует небольшие плотные скопления шаровидной формы. «Острова роста» разных размеров состоят из плоских полигональных одноядерных клеток с однородно окрашенной цитоплазмой и неокрашенными вакуолями (рис. 2А), соединяющимися в сети на поверхности стекла. В большинстве случаев «острова роста» имеют достаточно четкие границы, прослеживается тенденция к их слиянию. В «островах роста» встречаются также редкие мелкие шаровидные клетки с крупным ядром, интенсивно окрашенной цитоплазмой и ровной поверхностью. Шаровидные скопления клеток располагаются на стекле как поодиночке, так и группами, по внешнему виду напоминают тутовые ягоды. Клетки скоплений мелкие, интенсивно окрашенные, с короткими игольчатыми или закругленными отростками на поверхности, встречаются и клетки с ровной поверхностью (рис. 2Б,В). Клетки плотно прилегают друг к другу, что делает невозможным их подсчет на тотальных препаратах. Третий тип клеток, присутствующих в культуре нейробластомы SK-N-MC, – крупные распластанные клетки нейроноподобной формы с бледно окрашенной вакуолизированной цитоплазмой (рис. 2Г). Клетки содержат 1–2 ядра, встречаются многоядерные варианты. Нейроноподобные клетки в основном локализируются между «островными» клетками и выделяются на общем фоне своей обособленностью, они крайне редко контактируют с клетками других типов и вокруг них прослеживается пустое пространство, даже если они локализируются в центре «островов роста».

В культуре клеток нейробластомы SK-N-MC присутствуют также небольшие сильно вытянутые клетки веретеновидной или игольчатой формы с редкими вакуолями в цитоплазме (рис. 2Д). Таким образом, на светооптическом уровне в препаратах клеток нейробластомы SK-N-MC выявляются четыре морфологических типа клеток, переходные формы между которыми при использованном методе анализа не наблюдаются.

При инкубации клеток SK-N-MC, обработанных ОлигофактаминоTM в течение 24–72 ч, морфологические характеристики типов клеток не изменяются, на стеклах выявляются все описанные варианты. Наблюдается значительное увеличение общего

Таблица 2. Количество митозов в клетках SK-N-MC через 1–12 сут после трансфекции siCyc и siPKC (200 нМ)

Дни	Количество митозов на 1000 клеток				
	Контроль*	siScr	siCyc	siPKC	Контроль без трансфектанта
1	14 ± 5	16 ± 8	-	-	-
2	40 ± 16	25 ± 7	-	-	22 ± 15
3	21 ± 10	33 ± 12	15 ± 11	16 ± 7	-
5	-	-	30 ± 12	20 ± 11	-
7	-	-	28 ± 6	35 ± 5	-
12	-	-	30 ± 6	49 ± 14	-

*Клетки, обработанные только трансфектантом. (-) – не определяли.

количества клеток на стеклах за счет «островных» клеток, «острова роста» сливаются, и к концу 3 сут инкубации эти клетки составляют основную массу культуры. В «островных» клетках культуры SK-N-MC на протяжении 24–72 ч инкубации отмечаются многочисленные митозы (табл. 2). Количество и размеры шаровидных скоплений клеток, нейроноподобных и веретеновидных клеток заметно не меняются.

Сравнение препаратов интактных клеток SK-N-MC и клеток, обработанных ОлигофактаминоTM, не выявило заметных различий морфологических характеристик клеток. Обработка трансфектантом не приводит к появлению новых вариантов клеток либо к заметному изменению их соотношения. Трансфекция клеток SK-N-MC всеми siРНК также не приводит к появлению новых морфологических типов клеток: на всех сроках инкубации все препараты содержали описанные выше разновидности клеток. Трансфекция клеток SK-N-MC siScr не вызывала заметных изменений в соотношении клеток разного типа в течение 72 ч инкубации по сравнению с препаратами культуры, обработанной олигофактамино.

Изучение препаратов клеток нейробластомы SK-N-MC, полученных через разные промежутки времени после трансфекции, выявило отчетливые морфологические признаки воздействия siCyc и siPKC на жизнедеятельность клеток. При одинаковой «посевной» дозе за 3 сут инкубации клетки, обработанные ОлигофактаминоTM либо трансфицированные siScr, практически полностью заполняли площадь стекла (рис. 3Б,Г), тогда как трансфекция siCyc и siPKC резко замедляла размножение клеток, их число на стекле в это же время было несравненно меньше (рис. 3Д,Ж). Клетки, трансфицированные siCyc и siPKC, инкубировали в течение 12 сут (рис. 3Е,З), а трансфицированные siScr и контрольные клетки нуждались в пересеве каждые 3 сут. Раз-

личия в скорости роста и необходимость пересева контрольных и трансфицированных siScr-клеток не позволяют сравнить морфологические характеристики культуры, трансфицированной siCyc и siPKC, с контрольными препаратами через 5–12 сут инкубации, возможно лишь сопоставление препаратов, инкубированных в течение 72 ч после трансфекции. Препараты клеток SK-N-MC, трансфицированные siCyc и siPKC, в этот период содержали несравнимо меньше «островных» клеток, чем контрольные. Основная часть популяции была представлена мелкими интенсивно окрашенными клетками шаровых скоплений, располагавшихся по нескольку штук. На фоне снижения количества «островных» клеток возрастало относительное число нейроноподобных и веретеневидных клеток. Как и в контроле, митозы выявлялись в основном в «островных» клетках, и их число было резко снижено, особенно по сравнению с препаратами, трансфицированными siScr (табл. 2).

Таким образом, через 72 ч после трансфекции siCyc и siPKC в клетках нейробластомы существенно снижается митотическая активность «островных» клеток, уменьшается их число и соответственно изменяется соотношение между морфологическими типами клеток культуры, возрастает доля нейроноподобных и веретеневидных клеток.

Поздние эффекты (5–12 сут) трансфекции клеток нейробластомы siCyc и siPKC несколько различались. При использовании siCyc число митозов возрастало через 5 сут после трансфекции и оставалось на одном и том же уровне в течение всего периода наблюдений (табл. 2). Клетки в стадии митоза выявлялись главным образом среди «островных» клеток (рис. 2Е), число которых увеличивалось, тогда как количество шаровидных скоплений клеток, нейроноподобных и веретеневидных клеток заметно не изменялось. Следует отметить, что даже после 12 сут инкубации количество клеток нейробластомы на стеклах и число «островных» клеток было существенно меньше, чем в контроле через 72 ч после трансфекции (рис. 3Б,Г,Е). Трансфекция клеток нейробластомы siPKC вызывала более продолжительное снижение числа митозов, его рост регистрировался лишь на 7 сут после трансфекции и продолжался до конца наблюдений (табл. 2). Как и в случае трансфекции siCyc, митозы выявлялись преимущественно в «островных» клетках, число которых нарастало в течение инкубации. Через 5 сут после трансфекции siPKC сохранялось относительное увеличение числа нейроноподобных и веретеневидных клеток, отмеченное через 3 сут, количество шаровидных скоплений клеток не изменялось. Основную долю клеток нейробластомы SK-N-MC через 7 и 12 сут после транс-

фекции составляли «островные» клетки, количество которых интенсивно возрастало вследствие активного митотического деления (табл. 2). Плотность клеток на стекле через 12 сут после трансфекции была максимальной, и превышала плотность в контроле и при трансфекции siCyc (рис. 3Б,Г,Е,З). Таким образом, трансфекция siPKC приводит к более продолжительному блокированию митотического деления клеток нейробластомы SK-N-MC, чем трансфекция siCyc, однако последующий рост числа митозов более выражен и приводит к более интенсивному росту культуры клеток.

Анализ морфологических характеристик нейробластомы SK-N-MC показывает, что главная мишень siCyc и siPKC – «островные» клетки, составляющие основную часть клеточной популяции, и размножение которых подавляется. Воздействие siPKC, по-видимому, сложнее, чем siCyc, и требует дальнейшего изучения. Результаты микроскопического изучения роста клеток SK-N-MC после подавления экспрессии генов *CCNB1* и *PKC* (рис. 3) хорошо согласуются с данными по влиянию этого подавления на скорость пролиферации этих клеток (табл. 1).

ОБСУЖДЕНИЕ

Интерферирующие РНК рассматриваются в настоящее время как потенциальные терапевтические агенты, и уже целый ряд препаратов на их основе находится на различных стадиях клинических испытаний [48]. Выявление мишеней, временное подавление экспрессии которых приводит к необратимым для раковой клетки последствиям – терминальной дифференцировке, апоптозу, либо к долговременному подавлению их пролиферации, является актуальной проблемой. Опубликовано достаточно большое количество данных об успешном временном подавлении экспрессии генов, ответственных за возникновение онкологических заболеваний, в том числе генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC*, использованных нами в качестве мишеней siРНК [4, 6, 7, 49]. Показано, что такое подавление приводит к снижению скорости пролиферации раковых клеток, однако в большинстве опытов ограничиваются инкубацией до 96 ч, в то время как снижение уровня мРНК гена-мишени под действием siРНК сохраняется до 4–5 сут. Данные по длительности влияния siРНК на экспрессию генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC* отсутствуют, поэтому нами впервые изучены изменения уровня экспрессии этих генов в течение 12 сут после трансфекции специфичными siРНК. Нами показано, что максимальное снижение уровня экспрессии генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC* в клетках KB-3-1, SK-N-MC и MCF-7 наблюдается через 72 ч после трансфекции siРНК. Такое выключение экспрессии этих генов, как показано нами ранее [41],

в разной степени замедляет пролиферацию опухолевых клеток в период с 3 по 7 день их культивирования после трансфекции siРНК. Анализ кинетики изменения уровней специфических мРНК показал, что исходные уровни мРНК восстанавливаются уже на 5–7 день после однократной трансфекции соответствующей siРНК, что определяется, по-видимому, временем жизни siРНК в клетке (рис. 1). Длительность антипролиферативного действия siРНК в разных клеточных линиях существенно отличается. Определение скорости пролиферации клеток в период с 7 по 12 сут после трансфекции siРНК показало, что после восстановления исходного уровня экспрессии гена-мишени скорость пролиферации клеток линии KB-3-1 не отличается от скорости роста клеток в контроле: необработанных клеток, клеток, подвергнутых действию только трансфекционного агента, и клеток, трансфицированных случайной siРНК (siScr). Рост клеток линии MCF-7, трансфицированных специфическими siРНК, оставался несколько замедленным по сравнению с контролем. Таким образом, несмотря на обнаруженный нами выраженный антипролиферативный эффект препаратов siРНК, для ограничения роста этих клеточных линий необходимо поддерживать сниженный уровень экспрессии генов-мишеней. Этого можно добиться, повторно вводя в клетки соответствующие siРНК или используя шпилечные интерферирующие РНК (shРНК), которые экспрессируются непосредственно в клетках-мишенях после их трансдукции рекомбинантными вирусами (адено-, аденоассоциированными-, лентиви- и ретровирусами). Однако проблемы обеспечения безопасности применения рекомбинантных вирусов в терапевтических целях еще далеки от своего решения [50–52].

Мы обнаружили, что в культуре клеток SK-N-MC временное выключение экспрессии генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC* приводит к значительному замедлению деления клеток даже после восстановления исходного уровня мРНК генов-мишеней (табл. 1). Наиболее эффективной мишенью для достижения длительного подавления пролиферации в клетках нейробластомы SK-N-MC служат гены *CCNB1* и *PKC* (табл. 1). Выраженный антипролиферативный эффект (5–10 раз) кратковременного выключения экспрессии этих генов сохраняется до 12 сут инкубации. Следует отметить, что длительное антипролиферативное действие siРНК на клетки SK-N-MC является довольно неожиданным, поскольку в этих клетках не наблюдается гиперэкспрессия гена *PKC* [41]. Тем не менее, наглядно показан длительный антипролиферативный эффект этого специфического ингибитора в клетках SK-N-MC, выяснение причины которого требует дополнительного изучения.

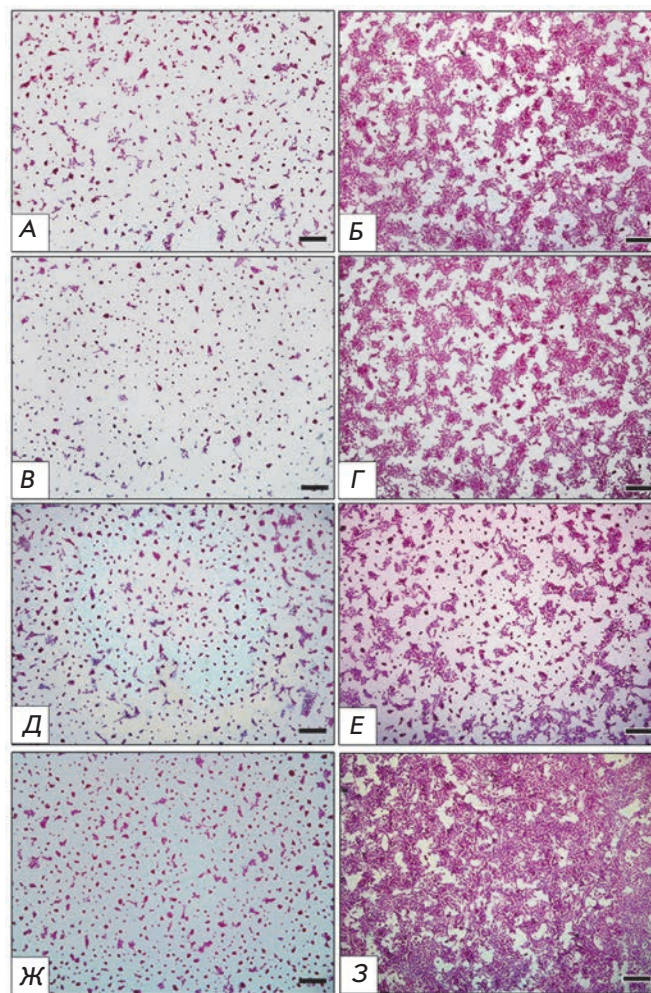


Рис. 3. Клетки нейробластомы SK-N-MC на стекле (тотальные препараты). Контрольные клетки (обработка только трансфектантом): А – 1 сут инкубации; Б – 3 сут инкубации. Трансфекция 200 нМ siScr: В – 1 сут инкубации; Г – 3 сут инкубации. Трансфекция siCyc: Д – 3 сут инкубации; Е – 12 сут инкубации. Трансфекция siPKC: Ж – 3 сут инкубации; З – 12 сут инкубации. Окраска гематоксилином. Длина масштабной линейки 200 мкм.

Скорость пролиферации клеток SK-N-MC остается значительно сниженной даже после того, как siCyc и siPKC перестают существовать в клетках, а уровень их генов-мишеней восстанавливается до исходного уровня. Это весьма неожиданный результат. По-видимому, этот феномен можно объяснить, учитывая специфический паттерн экспрессии генов в клетках нейронального происхождения, к которым относятся клетки SK-N-MC, изменение паттерна экспрессии под действием временного выключения генов-мишеней и его последующую реактивацию. В силу этого, вероятно, даже кратковременное ин-

гибирование экспрессии гена *CCNB1* или *PKC* может привести к очень медленному восстановлению скорости пролиферации клеток (или же к ее полной блокировке) даже после восстановления исходного уровня продуктов каждого из генов-мишеней. Известно, что в клетках данной линии наблюдается дефицит белка p53, т.е. в них отсутствует важнейший участник цепи индукции апоптоза, что, по-видимому, играет немаловажную роль в их неконтролируемой пролиферации [53]. Возможно, что отсутствие этого участника регуляторного каскада может быть одной из ключевых причин отличия последствий кратковременного ингибирования экспрессии генов *CCNB1* и *PKC* в этой и в других использованных нами клеточных линиях, скорость пролиферации которых восстанавливалась после того, как уровень гена-мишени возвращался к исходному. Возможно, было бы интересно изучить совместное действие siРНК и ингибиторов p53 на пролиферацию клеток разных линий. Как показали полученные нами результаты, после ингибирования экспрессии генов *CCNB1* и *PKC* в культуре клеток SK-N-MC несколько повышалась доля нейроноподобных и веретенновидных клеток, которые характеризовались более низкой митотической активностью, чем другие морфологические типы клеток в культуре. Повышение доли этих клеток может, вероятно, свидетельствовать об индукции начальных событий клеточной дифференцировки (обратимой или необратимой), которая также может быть одной из причин столь длительного антипролиферативного действия выбранных siРНК. Для проверки этих гипотез, необходимо изучить поведение клеток, подвергнутых действию siРНК в течение более длительного времени. Тем не менее, данные о длительном подавлении пролиферации могут указывать на важную роль генов *CCNB1* и *PKC* в агрессивной пролиферации SK-N-MC.

Изучение морфологии клеток SK-N-MC через 3–12 дней после трансфекции показало, что временное ингибирование экспрессии генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC* не приводит к их гибели или терминальной

дифференцировке, на что указывает сохранение разных типов клеток в популяции, а приводит к задержке клеточного деления. Постепенное увеличение к 10–12 сут инкубации суммарного количества клеток в препаратах, трансфицированных специфическими siРНК, и клеток в стадии митоза, в частности, указывает на то, что длительность антипролиферативного действия этих siРНК в клетках нейробластомы, по-видимому, ограничена 12–15 сут.

В настоящей работе на генетическом и морфологическом уровне показано, что гены *Her2*, *CCNB1* и *PKC* – эффективные мишени для специфически адресованных siРНК в клетках нейробластомы, поскольку достигаемое с их помощью снижение уровня экспрессии генов-мишеней приводит к эффективному и длительному ингибированию пролиферации. Применение siРНК для сдерживания роста опухолевых клеток, переживших химиотерапию, может стать одним из компонентов комплексной терапии при опухолевых заболеваниях и нейробластомах в частности. До настоящего времени в качестве противоопухолевых средств применялись низкомолекулярные соединения, найденные эмпирическим путем. Интерферирующие РНК могут стать новым поколением препаратов, существенно превосходящих известные по специфичности, эффективности и отсутствию токсичности. ●

Мы благодарим М.И. Мещанинову и А.Г. Вениаминову за синтез использованных в этой работе siРНК и А.В. Владимирову за помощь в работе с клеточными культурами.

Работа поддержана программами РАН «Молекулярная и клеточная биология» (грант № 22-1), «Фундаментальные науки – медицине» (грант № 37), Президентской программой поддержки ведущих научных школ (грант № НШ-7101.2010.4), РФФИ (грант № 11-04-01017-а) и Программой интеграционных исследований СО РАН (грант № 41).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sulic S., Panic L., Dikic I., Volarevic S. // *Croat. Med. J.* 2005. V. 46. P. 622–638.
2. Sandhu C., Slingerland J. // *Cancer Detect. Prev.* 2000. V. 24. P. 107–118.
3. Malumbres M., Hunt S.L., Sotillo R., Martin J., Odajima J., Martin A., Dubus P., Ortega S., Barbacid M. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2003. V. 532. P. 1–11.
4. Yuan J.P., Yan R.L., Kramer A., Eckerdt F., Roller M., Kaufmann M., Strebhardt K. // *Oncogene.* 2004. V. 23. P. 5843–5852.
5. Minana M.D., Felipe V., Cortes F., Grisolia S. // *FEBS Lett.* 1991. V. 284. P. 60–62.
6. Wu T.T., Hsieh Y.H., Hsieh Y.S., Liu J.Y. // *J. Cell. Biochem.* 2008. V. 103. P. 9–20.
7. Faltus T., Yuan J.P., Zimmer B., Kramer A., Loibl S., Kaufmann M., Strebhardt K. // *Neoplasia.* 2004. V. 6. P. 786–795.
8. Vermeulen K., van Bockstaele D.R., Berneman Z.N. // *Cell Prolif.* 2003. V. 36. P. 131–149.
9. Tuschl T. // *ChemBiochem.* 2001. V. 2. P. 239–245.
10. Tabara H., Grishok A., Mello C.C. // *Science.* 1998. V. 282. P. 430–431.
11. Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T. // *Nature.* 2001. V. 411. P. 494–498.

12. Yarden Y. // *Oncology*. 2001. V. 61. P. 1–13.
13. Nishizuka Y. // *Nature*. 1984. V. 308. P. 693–698.
14. Ali A.S., Ali S., El-Rayes B.F., Philip P.A., Sarkar F.H. // *Cancer Treat. Rev.* 2009. V. 35. P. 1–8.
15. Robert N.J., Favret A.M. // *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 2007. V. 21. P. 293–302.
16. Meric F., Hung M.C., Hortobagyi G.N., Hunt K.K. // *J. Am. Coll. Surg.* 2002. V. 194. P. 488–501.
17. Aaltonen K., Amini R.M., Heikkila P., Aittomaki K., Tamminen A., Nevanlinna H., Blomqvist C. // *Br. J. Cancer*. 2009. V. 100. P. 1055–1060.
18. Koivunen J., Aaltonen V., Peltonen J. // *Cancer Lett.* 2006. V. 235. P. 1–10.
19. Martiny-Baron G., Fabbro D. // *Pharmacological Res.* 2007. V. 55. P. 477–486.
20. Revillion F., Bonnetterre J., Peyrat J.P. // *Eur. J. Cancer*. 1998. V. 34. P. 791–808.
21. Williams T.M., Weiner D.B., Greene M.I., Maguire H.C. // *Pathobiology*. 1991. V. 59. P. 46–52.
22. Wright C., Angus B., Nicholson S., Sainsbury J.R., Cairns J., Gullick W.J., Kelly P., Harris A.L., Horne C.H. // *Cancer Res.* 1989. V. 49. P. 2087–2090.
23. Tandon A.K., Clark G.M., Chamness G.C., Ullrich A., Mcguire W.L. // *J. Clin. Oncol.* 1989. V. 7. P. 1120–1128.
24. Slamon D.J., Clark G.M., Wong S.G., Levin W.J., Ullrich A., Mcguire W.L. // *Science*. 1987. V. 235. P. 177–182.
25. Gulati S., Ytterhus B., Granli U.S., Gulati M., Lydersen S., Torp S.H. // *Diagn. Pathol.* 2010. V. 5. P. 18–26.
26. Soria J.C., Jang S.J., Khuri F.R., Hassan K., Lin D., Hong W.K., Mao L. // *Cancer Res.* 2000. V. 60. P. 4000–4004.
27. Yasuda M., Takesue F., Inutsuka S., Honda M., Nozoe T., Korenaga D. // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2002. V. 128. P. 412–416.
28. Song Y.M., Zhao C.L., Dong L.J., Fu M., Xue L., Huang Z., Tong T., Zhou Z., Chen A., Yang Z., et al. // *Carcinogenesis*. 2008. V. 29. P. 307–315.
29. Berchuck A., Rodriguez G., Kinney R.B., Soper J.T., Dodge R.K., Clarkepearson D.L., Bast R.C. // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1991. V. 164. P. 15–21.
30. Berchuck A., Kamel A., Whitaker R., Kerns B., Olt G., Kinney R., Soper J.T., Dodge R., Clarke-Pearson D.L., Marks P., et al. // *Cancer Res.* 1990. V. 50. P. 4087–4091.
31. Marks J.R., Humphrey P.A., Wu K., Berry D., Bandarenko N., Kerns B.J.M., Iglehart J.D. // *Ann. Surg.* 1994. V. 219. P. 332–341.
32. Carr J.A., Havstad S., Zarbo R.J., Divine G., Mackowiak P., Velanovich V. // *Arch. Surg.* 2000. V. 135. P. 1469–1474.
33. Casalini P., Iorio M.V., Galmozzi E., Menard S. // *J. Cell. Physiol.* 2004. V. 200. P. 343–350.
34. Yamamoto T., Ikawa S., Akiyama T., Semba K., Nomura N., Miyajima N., Saito T., Toyoshima K. // *Nature*. 1986. V. 319. P. 230–234.
35. Pines J., Hunter T. // *Ciba Fdn. Symp.* 1992. V. 170. P. 187–204.
36. Sutherland R.L., Watts C.K.W., Musgrove E.A. // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1993. V. 47. P. 99–106.
37. Gomez L.A., de las Pozas A., Reiner T., Burnstein K., Perez-Stable C. // *Mol. Cancer Ther.* 2007. V. 6. P. 1534–1543.
38. Sarafan-Vasseur N., Lamy A., Bourguignon J., Le Pessot F., Hieter P., Sesboüé R., Bastard C., Frébourg T., Flaman J.M. // *Oncogene*. 2002. V. 21. P. 2051–2057.
39. Newton A.C. // *Chem. Rev.* 2001. V. 101. P. 2353–2364.
40. Clemens M.J., Trayner I., Menaya J. // *J. Cell Sci.* 1992. V. 103. P. 881–887.
41. Акимов И.А., Черноловская Е.Л. // *Мол. биол.* 2010. Т. 44. С. 98–106.
42. Amarzguioui M., Rossi J.J., Kim D. // *FEBS Lett.* 2005. V. 579. P. 5974–5981.
43. Hohjoh H. // *FEBS Lett.* 2004. V. 557. P. 193–198.
44. Matveeva O., Nechipurenko Y., Rossi L., Moore B., Saetrom P., Ogurtsov A.Y., Atkins J.F., Shabalina S.A. // *Nucl. Acids Res.* 2007. V. 35. P. 1–10.
45. Chattopadhyay N., Kher R., Godbole M. // *Biotechniques*. 1993. V. 15. P. 24–26.
46. Carmichael J., Degraff W.G., Gazdar A.F., Minna J.D., Mitchell J.B. // *Cancer Res.* 1987. V. 47. P. 936–942.
47. Пирс Э. Гистохимия. М.: Иностран. лит., 1962. 962 с.
48. Castanotto D., Rossi J.J. // *Nature*. 2009. V. 457. P. 426–433.
49. Choudhury A., Charo J., Parapuram S.K., Hunt R.C., Hunt D.M., Seliger B., Kiessling R. // *Int. J. Cancer*. 2004. V. 108. P. 71–77.
50. Blankinship M.J., Gregorevic P., Chamberlain J.S. // *Mol. Ther.* 2006. V. 13. P. 241–249.
51. Gao G.P., Wilson J.M., Wivel N.A. // *Adv. Virus Res.* 2000. V. 55. P. 529–543.
52. Snyder R.O., Flotte T.R. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2002. V. 13. P. 418–423.
53. Choi M.S., Yuk D.Y., Oh J.H., Jung H.Y., Han S.B., Moon D.C., Hong J.T. // *Anticancer Res.* 2008. V. 28. P. 3777–3784.

УДК 576.315.42

Искусственные вирусоподобные частицы, полученные *in vitro* из белка оболочки X-вируса картофеля и чужеродных вирусных РНК

М. В. Архипенко¹, Е. К. Петрова¹, Н. А. Никитин¹, А. Д. Протопопова^{2,3}, Е. В. Дубровин³, И. В. Яминский^{2,3}, Н. П. Родионова¹, О. В. Карпова¹, И. Г. Атабеков^{1,4}

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

²Центр перспективных технологий, 119311, Москва, ул. Строителей, 4, корп. 5

³Физический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 2

⁴Научно-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: okar@genebee.msu.su

Поступила в редакцию 21.04.2011 г.

РЕФЕРАТ X-вирус картофеля (ХВК) и ряд других потексвирусов способны к реконструкции *in vitro* из вирусного белка оболочки и РНК. Белок оболочки потексвирусов способен образовывать вирусные рибонуклеопротеиды (вРНП) не только с гомологичной РНК, но и с гетерологичными нуклеиновыми кислотами. В представленной работе изучены структура и свойства вРНП, полученных *in vitro* при инкубации белка оболочки ХВК с РНК вирусов растений и животных, относящихся к различным таксономическим группам. Показано, что при инкубации с белком оболочки ХВК различных чужеродных (гетерологичных) РНК образуются вРНП, морфологически и по трансляционным свойствам подобные гомологичным вРНП (РНК ХВК – белок оболочки ХВК). Можно предположить, что инициация сборки «смешанных» вРНП *in vitro* так же, как и гомологичных, начинается с 5'-концевого района РНК, и при взаимодействии гетерологичных РНК с белком оболочки ХВК образуется белковая оболочка, сходная по структуре с оболочкой гомологичных частиц. По-видимому, образование *in vitro* гетерологичных вРНП с участием белка оболочки ХВК не зависит от специфической нуклеотидной последовательности 5'-конца РНК, и белок оболочки ХВК способен упаковать чужеродный генетический материал различного размера и состава в вирусоподобные искусственные частицы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА вирусы растений, РНК, вирусные рибонуклеопротеиды, трансляционные свойства.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ХВК – X-вирус картофеля; вРНП – вирусный рибонуклеопротеид; ТБ – транспортный белок.

ВВЕДЕНИЕ

Белковый капсид многих фитовирусов состоит из идентичных субъединиц белка оболочки, упакованных на основе спиральной симметрии. Геномная вирусная РНК спирально расположена между витками субъединиц белка оболочки и следует их укладке. Важной особенностью ряда вирусов является возможность обратимой диссоциации вирионов на белки оболочки и РНК с последующей самосборкой вирусных рибонуклеопротеидов (вРНП) *in vitro*. В результате удается восстановить структуру и биологическую активность вируса [1, 2]. Самосборка (ре-

полимеризация) низкомолекулярного белка оболочки может происходить и в отсутствие РНК с образованием частиц, по структуре идентичных вирусным, но не ограниченных по длине [3].

Процедура самосборки позволяет получать «смешанные» вРНП, состоящие из вирусного белка оболочки и ряда гетерологичных РНК [4, 5]. Доступность конструирования вирусов, содержащих чужеродные РНК, открывает определенные перспективы применения «смешанных» искусственных вРНП для доставки чужеродных РНК в клетки-мишени и органы растений и, возможно, животных. Вирусы растений удобны для формирования «смешанных» вРНП, по-

сколькx они отличаются высокой стабильностью, полной биологической безопасностью (растения и животные не имеют общих патогенов) и низкой себестоимостью процедуры сборки вРНП. Последнее обусловлено исключительно высоким уровнем накопления ряда вирусов в зараженном растении (4–10 г/кг листьев).

Другое преимущество вРНП состоит в возможности контролируемой активации трансляции РНК, инкапсулированной в белок оболочки. Вирусы и «смешанные» вРНП могут структурно изменяться под воздействием ряда факторов (рН, фосфорилирование, присутствие определенных вирус-специфических белков-активаторов).

При конструировании вРНП наиболее предпочтительны спиральные вирусы растений, весьма стабильные в условиях высоких температур, нефизиологических значений рН среды, а также в присутствии гидролитических ферментов. Кроме того, длина спирального вируса зависит от размера нуклеиновой кислоты, что, в отличие от изометрических вирусов, не накладывает жестких ограничений на длину РНК, включаемой в вРНП при сборке *in vitro*. Несколько опережая развитие событий, логично предположить, что модифицированные и «смешанно» реконструированные спиральные вирусы растений могут служить контейнерами для хранения и доставки в клетки «терапевтических» генов и лекарственных средств [3].

Один из представителей фитовирусов со спиральной структурой – X-вирус картофеля (ХВК), типичный представитель рода *Potexvirus* семейства *Flexiviridae*. Вирионы ХВК представляют собой гибкие нитевидные частицы длиной 515 нм и диаметром 13.5 нм. Вирусная частица содержит около 1350 идентичных субъединиц белка оболочки, упакованных в виде спирали, между оборотами которой заключена вирусная РНК [6]. Оборот первичной спирали ХВК состоит из 8.9 субъединиц белка оболочки. Геном ХВК представлен одноцепочечной «плюс» РНК длиной 6345 н. [7]. Геномная РНК содержит на 5'-конце кеп, а на 3'-конце – поли(А)-последовательность [8]. РНК ХВК кодирует пять белков: вирусную репликазу массой 165 кДа и четыре белка, ответственных за межклеточный и системный транспорт инфекционного материала – три транспортных белка (ТБ1, ТБ2, ТБ3 – продукты «тройного блока генов», с массами 25, 12 и 8 кДа соответственно) и белок оболочки массой 25 кДа [8].

Ранее было показано, что белок оболочки потексвирусов способен *in vitro* образовывать вРНП не только с гомологичной РНК, но и с некоторыми гетерологичными РНК [9, 10].

Цель настоящей работы состояла в изучении особенностей структуры и свойств вРНП, получен-

ных *in vitro* при инкубации белка оболочки ХВК с РНК ряда вирусов растений и животных, принадлежащих к различным таксономическим группам. В качестве гетерологичных РНК использовали РНК потексвирусов (ВМН – вирус мозаики нарцисса, ВАМК – вирус аюкуба мозаики картофеля, ВМАльт – вирус мозаики альтернантеры), тобамовируса (ВТМ – вирус табачной мозаики), бромовируса (ВМК – вирус мозаики костра) и пикорнавируса Менго (вирус животных).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выделение препарата ХВК, белка оболочки и РНК ХВК и ТБ1

Препарат ХВК (Русский штамм) выделяли из зараженных растений *Datura stramonium* L. согласно Атабекову и соавт. [11]. Белок оболочки ХВК получали методом солевой депротеинизации [12]. РНК выделяли фенольным методом [13] с некоторыми модификациями. Рекомбинантный белок ТБ1 получен как описано ранее [14].

Получение вРНП *in vitro*

Для получения вРНП смешивали РНК и белок оболочки в весовом соотношении (w/w) РНК : белок оболочки = 1 : 10. Инкубацию проводили в стандартных условиях [15]: в 20 мкл 0.01 М Трис-НСl-буфера рН 7.5 при комнатной температуре в течение 20 мин. Реакцию останавливали, добавляя бромфеноловый синий или перенося инкубационную смесь на лед (0°C).

Трансляция *in vitro*

Трансляцию РНК в бесклеточной белоксинтезирующей системе из экстракта зародышей пшеницы проводили, как описано ранее [14], в присутствии ³⁵S-метионина в течение 60 мин при 25°C. Количество РНК в пробе составляло 40 мкг/мкл (в случае РНК вируса Менго – 25 мкг/мкл). Рекомбинантный ТБ1 для трансляционной активации РНК в составе вРНП добавляли в молярном соотношении ХВК : ТБ1 = 1 : 100, т.е. на 1 мкг РНК (20 мкг вируса) 1.4 мкг ТБ1.

Просвечивающая электронная микроскопия

Образцы (15 мкл) сорбировали на медных сетках для электронной микроскопии, покрытых формваровой пленкой (при нанесении пленки использовали 0.5% раствор формвара в дихлорэтаноле) в течение 15–20 с, после чего образцы на сетках контрастировали 2% раствором уранилацетата и просматривали на электронном микроскопе JEOL JEM-1011 («JEOL», Япония) при 80 кВ. Изображения получали с помощью цифровой камеры Gatan Erlangshen ES500W

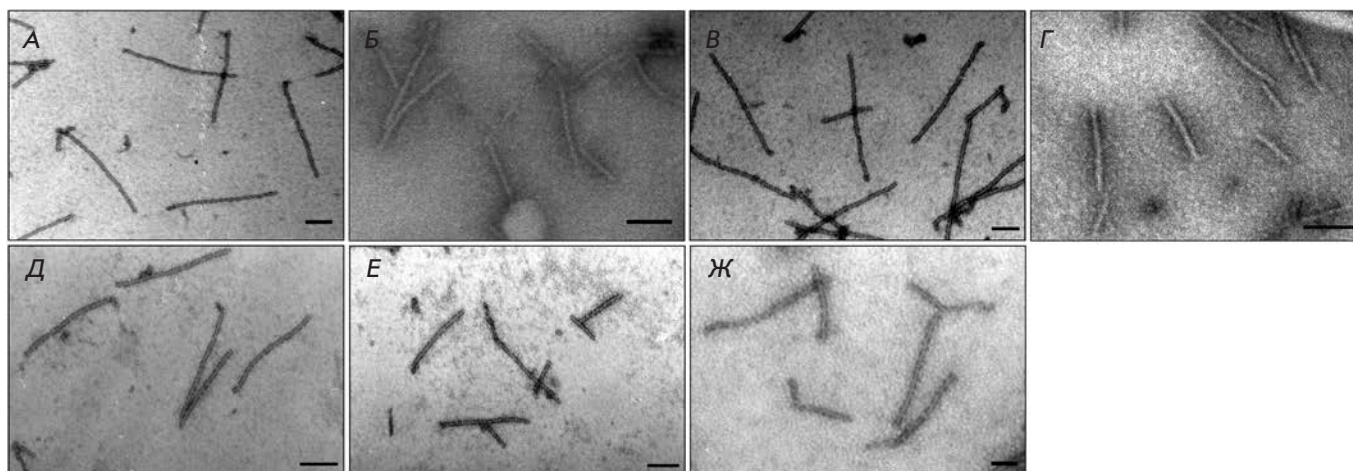


Рис. 1. Электронная микрофотография вРНП, собранных *in vitro* при инкубации белка оболочки ХВК и гомологичной и гетерологичных РНК. А – РНК ХВК; Б – РНК ВМН; В – РНК ВАМК; Г – суммарная РНК ВМК; Д – РНК вируса Менго; Е – РНК ВТМ; Ж – РНК ВМАльт. Весовое соотношение РНК : белок оболочки = 1 : 10. Образцы обрабатывали 2% уранилацетатом. Масштабные отрезки 100 нм.

с использованием программного обеспечения «Gatan Digital Micrograph»™.

Атомно-силовая микроскопия (АСМ)

Сканирование проводили на микроскопах Nanoscope 3a («Digital Instruments», Santa Barbara, США) и SmartSPM («Аист-НТ», Россия) в резонансном режиме на воздухе. Типичная скорость сканирования – 1 Гц. Использовали кантилеверы fpN01S с резонансной частотой 118–190 кГц, жесткостью 5.3 Н/м и гарантированным радиусом закругления иглы 10 нм (НИИФП им. Ф.В. Лукина, Россия). Для обработки и представления АСМ-изображений использовали программу ФемтоСкан Онлайн (ЦПТ, Россия). Для приготовления образцов на свежеисколотую слюду или высокоориентированный пиролитический графит на 5–10 мин наносили 5–10 мкл препарата требуемой концентрации. Затем образец 2 раза промывали в капле дистиллированной воды и высушивали на воздухе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Методом сборки *in vitro* получен ряд вРНП из белка оболочки ХВК и РНК вирусов, принадлежащих к различным таксономическим группам. В качестве гетерологичных использовали РНК вирусов, перечисленных выше: четырех потексвирусов (ХВК, ВМН, ВАМК, ВМАльт), тобамовируса (ВТМ), бромовируса (ВМК, икосаэдрический вирус с функционально фрагментированным геномом) и пикорнавируса Менго (вирус животных). В качестве контроля использовали гомологичную РНК ХВК.

Известно, что белок оболочки ХВК не способен сформировать вирусоподобные агрегаты в отсутствие РНК [16]. Из *рис. 1* следует, что при инкубации белка оболочки ХВК с гетерологичными РНК различных вирусов в соотношении РНК : белок оболочки = 1 : 10 (w/w) в просвечивающем электронном микроскопе (ПЭМ) можно наблюдать частицы (*рис. 1Б–Ж*), морфологически неотличимые от частиц, полученных при реконструкции белка оболочки ХВК с гомологичной РНК ХВК (*рис. 1А*). Ранее мы показали, что гомологичные вРНП «РНК ХВК – белок оболочки ХВК», образованные при инкубации РНК и белка оболочки ХВК, идентичны по своей структуре нативным вирионам ХВК [15].

Морфологию вРНП анализировали с применением высокоразрешающей АСМ. Методом АСМ были исследованы частицы вРНП, содержащие гомологичные и гетерологичные РНК. Изображения вРНП, полученных при инкубации белка оболочки ХВК с гетерологичными РНК (*рис. 2Б–Е*), идентичны изображениям гомологичных вРНП (*рис. 2А*). По данным АСМ средняя высота гомологичного комплекса составила 10.0 ± 0.6 нм, гетерологичных – 9.9 ± 0.9 нм (*рис. 3*). В пределах погрешности эти значения совпадают между собой и соответствуют высоте нативного ХВК (данные не приведены). Как отмечалось выше, диаметр вириона ХВК равен 13.5 нм [6]. Результаты определения высоты гомологичных комплексов методом АСМ согласуются с этой величиной [17]. Однако высота и ширина вирусной частицы, определенные методом АСМ, могут варьировать в зависимости от типа использованного зонда, способа приго-

товления образца и величины силового воздействия. Как правило, при измерениях на воздухе высота вирионов ХВК оказывается заниженной и составляет 10–11 нм. Это связано с тем, что в ходе сканирования зонд микроскопа оказывает давление на образец и слегка сплющивает его [18].

Ранее с применением ПЭМ и АСМ [15] были выявлены «однохвостые частицы» (single tailed particles, STPs) с 3'-концом РНК ХВК, свободным от белка обо-

лочкой, и палочковидными «головками», сформированными в результате спиральной упаковки белка оболочки на 5'-концевом фрагменте РНК.

Соотношение РНК : белок оболочки = 1 : 10 (w/w) в инкубационной смеси при сборке вРНП гарантирует отсутствие избытка свободного белка оболочки на поверхности образцов. С другой стороны, этого количества белка оболочки недостаточно для инкапсидации всей РНК. В результате АСМ выявляет частицы, у которых часть молекулы РНК в составе вРНП остается свободной от белка оболочки (рис. 2А,Б,Е). Следует отметить, что свободные «хвосты» РНК имеют не все короткие вРНП (рис. 2В–Д). Это может быть следствием гидролиза свободного от белка оболочки 3'-конца РНК рибонуклеазами в растворе или при помещении суспензии частиц на поверхность слюды перед анализом.

В процессе самосборки РНК с вирусным белком оболочки образуется гетерогенный по длине набор вРНП (рис. 3). Частицы, содержащие полностью инкапсидированную РНК, не выявлены даже при анализе гомологичного варианта (рис. 3А). Длина наиболее полно реконструированных вРНП ХВК достигала 300 нм, в то время как модальная длина нативных вирионов составляет 515 нм. По-видимому, уменьшение длины вРНП обусловлено недостатком белка оболочки в инкубационной среде (соотношение РНК : белок оболочки составляло 1 : 10 вместо 1 : 20, используемого при реконструкции полноразмерных частиц ХВК).

Увеличение количества белка в инкубационной смеси (в расчете на молекулу РНК) приводит к увеличению длины «смешанных» (гетерологичных) частиц. Так при соотношении РНК : белок оболочки = 1 : 10 гетерологичные частицы, образованные после «одевания» белком РНК потексвируса ВМН, ВАМК и тобамовируса ВТМ, имели среднюю длину 200 нм и были аналогичны по длине вРНП ХВК (рис. 3А). Размер РНК этих вирусов сопоставим с размером РНК ХВК. При применении более коротких вирусных РНК (суммарный препарат РНК ВМК состоит из четырех РНК длиной от 800 до 3234 н.) молярное соотношение РНК : белок оболочки уменьшалось, и возрастало количество коротких частиц (80–100 нм) (рис. 3Б). С другой стороны, при инкубации с белком оболочки ХВК РНК вируса Менго (8400 н.) молярное соотношение увеличивалось, и средний размер частиц увеличивался до 400–450 нм (рис. 3В).

Ранее мы показали, что, в отличие от ВТМ и ряда других вирусов, молекула РНК в составе нативных частиц ХВК и гомологичных «однохвостых» вРНП (РНК ХВК – белок оболочки ХВК) недоступна для трансляции. Однако трансляция РНК активируется при фосфорилировании белка оболочки ХВК

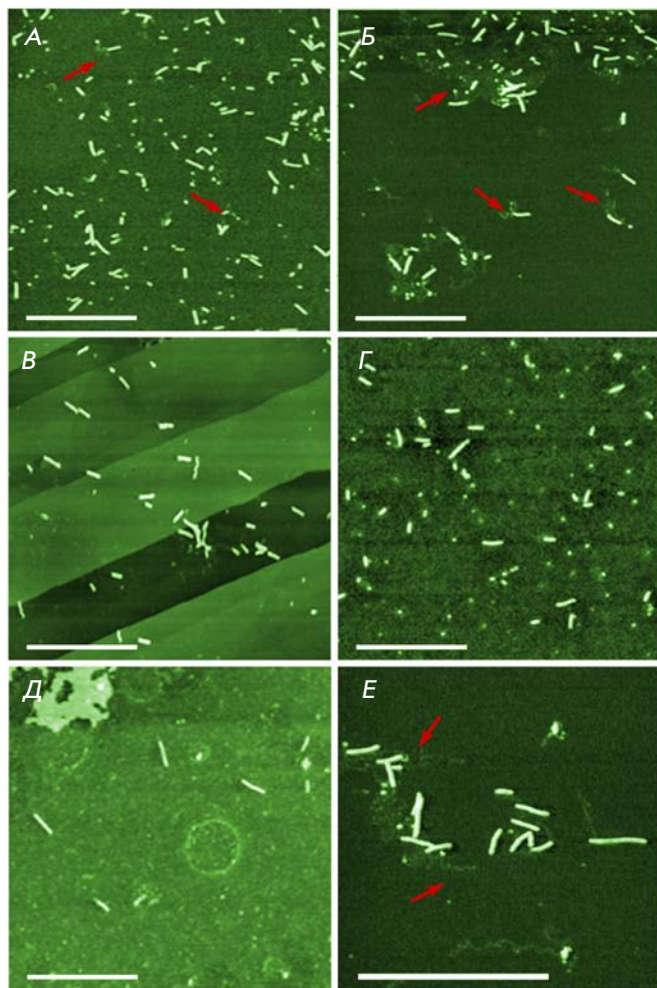
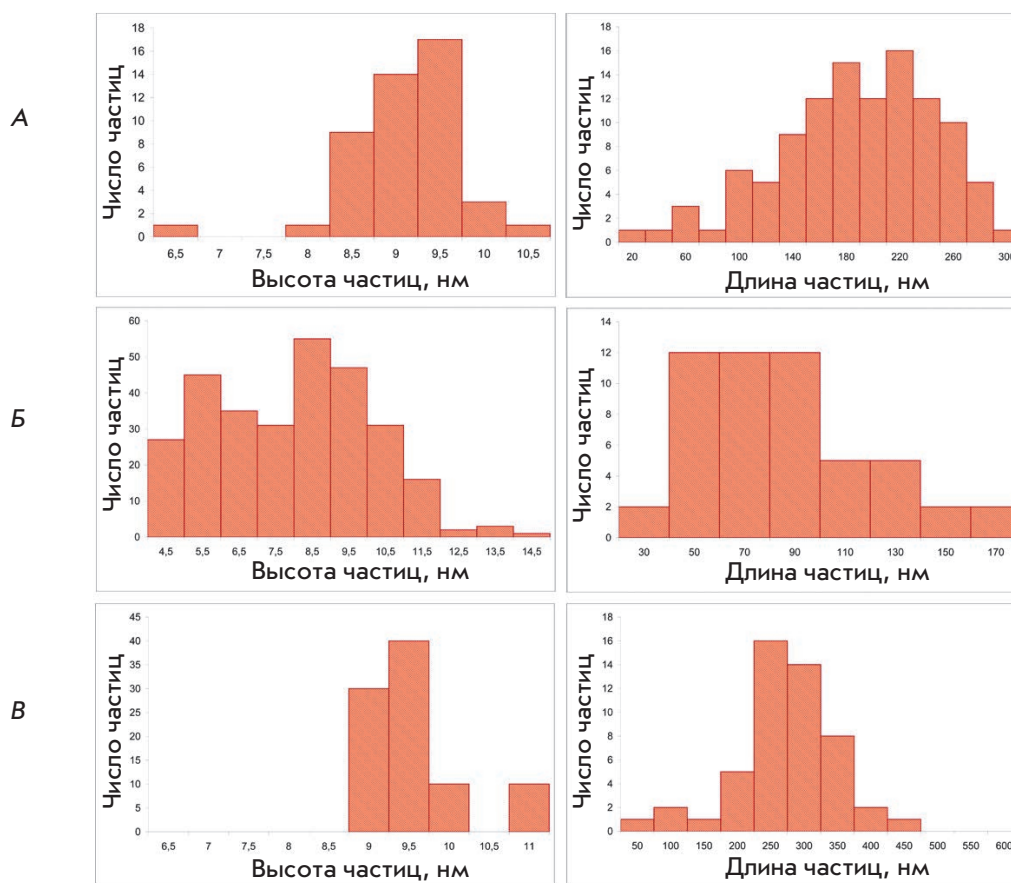


Рис. 2. АСМ-изображения вРНП, собранных *in vitro* при инкубации белка оболочки ХВК с гомологичной и гетерологичными РНК. А – РНК ХВК на слюде; Б – РНК ВТМ на слюде; В – РНК ВМН на графите; Г – суммарная РНК ВМК на слюде; Д – РНК вируса Менго на слюде; Е – РНК ВАМК на слюде. Весовое соотношение РНК : белок оболочки = 1 : 10. Образцы высушивали на воздухе. Частота колебаний консоли 300–350 кГц. Стрелками указаны участки РНК в составе вРНП, свободные от белка оболочки ХВК. Масштабные отрезки 1 мкм.

Рис. 3. Гистограммы распределения высоты и длины полученных вРНП, составленные по данным АСМ. Белок оболочки ХВК инкубировали с РНК при весовом соотношении 10 : 1. А – РНК ХВК; Б – суммарная РНК ВМК; В – РНК вируса Менго.



или при образовании комплекса вириона или вРНП с ТБ1 ХВК [11, 15, 19].

В настоящей работе мы изучали трансляционные свойства и специфичность активации трансляции «смешанных» вРНП с применением ТБ1.

В контрольных опытах было показано, что взаимодействие РНК ХВК с белком оболочки ХВК приводит к ингибированию трансляции РНК в составе вРНП по сравнению со свободной РНК (рис. 4А, 1, 2). Наблюдаемый фоновый уровень трансляции (рис. 4А, 2) можно объяснить присутствием свободной РНК в условиях недостатка белка оболочки при инкубации [15]. При увеличении молярного соотношения РНК : белок оболочки количество свободной РНК уменьшается, и уровень фоновой трансляции падает [15].

С другой стороны, взаимодействие с ТБ1 вРНП, состоящих из гомологичных белков оболочки и РНК, приводит к эффективной активации трансляции инкапсидированной РНК ХВК (рис. 4А, 1, 3).

Важно отметить, что аналогичные результаты получены при анализе трансляционной активности гетерологичных РНК в составе вРНП, реконструиро-

ванных с белком оболочки ХВК (рис. 4Б–Е). При добавлении белка оболочки ХВК к РНК при соотношении 10 : 1 (w/w) в инкубационной смеси наблюдается заметное подавление трансляции РНК ВМК (рис. 4Б, 1, 2), РНК ВАМК (рис. 4В, 1, 2), РНК ВМН (рис. 4Г, 1, 2), РНК ВТМ (рис. 4Д, 1, 2) и РНК Менго (рис. 4Е, 1, 2) в составе вРНП по сравнению с тем же количеством свободной РНК. Если количество белка оболочки увеличить до соотношения РНК : белок оболочки = 1 : 30, то удастся добиться практически полного подавления трансляции инкапсидированной РНК. На рис. 4 представлены результаты для РНК ВМК (рис. 4Б, 4), ВМН (рис. 4Г, 4) и ВТМ (рис. 4Д, 4). При добавлении ТБ1 к «смешанным» вРНП происходит трансляционная активация (рис. 4Б–Е, 3), и эффективность трансляции восстанавливается до уровня свободной РНК (рис. 4Б–Е, 1). Из рис. 4 следует, что набор пептидов, образующихся при трансляции РНК в составе ТБ1-активированных вРНП, идентичен продуктам трансляции свободной РНК. Полученные результаты предполагают, что структура белковой оболочки «смешанных» (гетерологичных) и гомологичных вРНП весьма сходна.

Ранее мы показали, что при ТБ1-зависимой активации трансляции РНК в составе вирусных частиц или гомологичных вРНП решающую роль играют белок-белковые взаимодействия белок оболочки-ТБ1 [15, 20]. Основная роль во взаимодействии белка оболочки с ТБ1, по-видимому, принадлежит С-концевой области белка оболочки ХВК [21].

Результаты трансляционной активации гетерологичных РНК в составе «смешанных» искусственных вРНП служат новым доказательством главной роли белка оболочки в этом феномене.

Специфическое узнавание вирусных РНК структурным белком играет ключевую роль в инкапсидации вирусных РНК-геномов при сборке вирусной частицы. В молекулах РНК ряда вирусов растений (ВТМ, ВМК, вируса морщинистости турнепса) идентифицированы сигналы сборки с белком оболочки (origin of assembly, OAS) [22–25]. В частности, показана важность 5'-концевой области геномной РНК в процессах сборки вируса и репликации РНК потексвирусов [26].

Kwon и соавт. [27] идентифицировали участок инициации сборки ХВК *in vitro* в составе 5'-концевого фрагмента РНК ХВК (51–84 н.), образующего структуру в виде «петли со шпилькой» (stem-loop 1, SL1). Кроме того, регуляторные элементы, необходимые для связывания РНК с белком оболочки, локализованы в области 1–107 н. РНК ХВК [28]. Полученные нами результаты анализа трансляционных свойств гетерологичных вРНП позволяют допустить, что инициация сборки гетерологичных вРНП *in vitro* также начинается с 5'-концевого района РНК и продолжается в 5'-3'-направлении. Этот вывод правомерен для РНК потексвирусов (ВМН, ВАМК). Однако сигнал для специфической сборки ВТМ расположен в 3'-концевой области, а у ВМК в инициации сборки играют роль тРНК-подобная 3'-концевая структура и элементы гена полимеразы. РНК вируса Менго (род *Cardiovirus* семейства *Picornaviridae*) длиной 8400 н. содержит на 5'-конце вирус-специфический белок VPg [29], присоединенный к РНК фосфодиэфирной связью, а ее 3'-конец полиаденилирован [30]. Не совсем понятно, какие сайты узнает белок оболочки ХВК при инициации одевания гетерологичных РНК, хотя, исходя из результатов трансляционной активации, наиболее вероятно, что одевание начинается с 5'-конца. Особенно удивительно, что трансляция РНК вируса Менго, которая имеет внутренний сайт инициации трансляции, также ингибируется при связывании с белком оболочки ХВК и активируется при добавлении ТБ1. Таким образом, можно думать, что инициация образования вРНП определяется белком, по крайней мере, в случае белка оболочки ХВК и, вероятно,

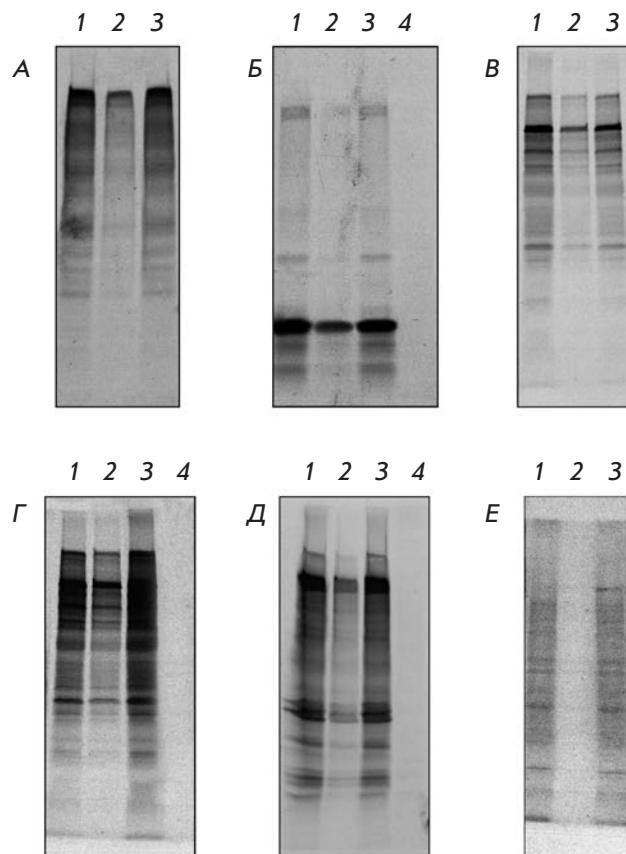


Рис. 4. Трансляционная активация РНК в составе вРНП *in vitro*. вРНП образованы при инкубации белка оболочки ХВК с гомологичной и гетерологичными РНК при весовом соотношении 10 : 1, за исключением дорожки 4 на частях Б, Г, Д, где соотношение белок оболочки : РНК = 30 : 1. Электрофоретический анализ в 8–20% денатурирующем полиакриламидном геле меченных ³⁵S продуктов трансляции в экстракте из зародышей пшеницы. А – РНК ХВК; Б – суммарная РНК ВМК; В – РНК ВАМК; Г – РНК ВМН; Д – РНК ВТМ; Е – РНК вируса Менго. 1 – РНК; 2 – РНК + белок оболочки ХВК; 3 – (РНК + белок оболочки ХВК) + ТБ1 ХВК.

белка оболочки вируса мозаики папайи по данным Abouhaidar и Bancroft [31]. Сборка белка оболочки ХВК и гетерологичных РНК начинается с участков, значительно отличающихся по локализации и составу от сайтов инициации сборки в том случае, когда РНК взаимодействует с собственным белком.

Можно предположить, что в условиях нашего эксперимента белок оболочки ХВК узнает не специфическую нуклеотидную последовательность в молекуле РНК, а определенную структуру 5'-концевого района РНК, инициирующую образование вРНП.

ВЫВОДЫ

Показано, что при инкубации с белком оболочки ХВК различных чужеродных гетерологичных РНК *in vitro* образуются вРНП, которые по своей морфологии и трансляционным свойствам подобны гомологичным вРНП (РНК ХВК – белок оболочки ХВК). Можно предположить, что при взаимодействии гетерологичных РНК с белком оболочки ХВК образуется белковая оболочка, сходная по структуре с оболочкой гомологичных частиц. По-видимому, образование гетерологичных вРНП *in vitro* с участием белка оболочки ХВК инициируется на 5'-конце молекулы РНК и не зависит от специфической нуклеотидной последовательности 5'-концевого района РНК. В результате белок оболочки ХВК способен упаковать чужеродный генетический материал различного размера в вирусоподобную искусственную частицу. В составе вРНП гетерологичная РНК так же, как и гомологичная, недоступна для рибосом. Однако она становится трансляционно активной при инкубации полученных вРНП с ТБ1 ХВК. Связывание ТБ1 с одним из концов вириона ХВК индуцирует конформационные изменения в терминальных субъединицах белка оболочки,

что приводит к дестабилизации (ремоделированию) и переходу белковой спирали в метастабильное состояние. Последующая ТБ1-зависимая трансляционная разборка частиц ХВК происходит быстро и, вероятно, кооперативно с высвобождением свободной РНК и субъединиц белка на ранних стадиях трансляции [20]. Весьма вероятно, что подобный механизм реализуется в описанных выше примерах трансляционной активации «смешанных» вРНП с участием ТБ1.

Белки оболочки вирусов растений со спиральной структурой в перспективе, вероятно, могут применяться для создания и введения в органы-мишени искусственных «гибридных» наночастиц (вРНП), способных разбираться *in vivo* под контролем различных факторов. ●

Работа частично поддержана грантами РФФИ (№ 10-04-000-89а) и Министерства образования и науки РФ (ГК № 02.740.11.0789). Выражаем благодарность компании AIST-NT и лично М. Савватееву за анализ образцов методом АСМ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Butler P.J.G. // *Philos. Trans. R. Soc. London. B.* 1999. V. 354. P. 537.
- Klug A. // *Philos. Trans. R. Soc. London B.* 1999. V. 354. P. 531.
- Атабеков И.Г. // *Российские нанотехнологии.* 2008. Т. 3. № 1–2. С. 130–139.
- Atabekov J.G., Novikov K., Vishnichenko K., Kaftanova A.S. // *Virology.* 1970. V. 41. P. 519.
- Fraenkel-Conrat H., Singer B. // *Philos. Trans. R. Soc. London. B.* 1999. V. 354. P. 583.
- Tollin P., Wilson H.R. // *The Filamentous Plant Viruses in the Plant Viruses 4* / Ed. Milne R.C. New York: Plenum Press, 1988. P. 51–83.
- Skryabin K.G., Morozov S.Yu., Kraev A.S., Rozanov M.N., Chernov B.K., Lukasheva L.I., Atabekov J.G. // *FEBS Lett.* 1988. V. 240. P. 33–40.
- Morozov S.Yu., Miroshnichenko N.A., Zelenina D.A., Fedorkin O.N., Solovyev A.G., Lukasheva L.I., Karasev A.V., Dolja V.V., Atabekov J.G. // *J. Gen. Virol.* 1991. V. 72. P. 2039–2043.
- Новиков В.К., Кимазев В.З., Атабеков И.Г. // *ДАН.* 1972. Т. 204. С. 1259–1262.
- Erickson J.W., Bancroft J.B. // *Virology.* 1978. V. 90. P. 60–66.
- Atabekov J.G., Rodionova N.P., Karpova O.V., Kozlovsky S.V., Poljakov V.Y. // *Virology.* 2000. V. 271. № 2. P. 259–263.
- Goodman R.M., Horne R.W., Hobart J.M. // *Virology.* 1975. V. 68. P. 299–308.
- Fraenkel-Conrat H., Singer B., Tsugita A. // *Virology.* 1961. V. 14. P. 54–58.
- Karpova O.V., Ivanov K.I., Rodionova N.P., Dorokhov Yu.L., Atabekov J.G. // *Virology.* 1997. V. 230. P. 11–21.
- Karpova O.V., Zayakina O.V., Arkhipenko M.V., Sheval E.V., Kiseleva O.I., Poljakov V.Yu., Yaminsky I.V., Rodionova N.P., Atabekov J.G. // *J. Gen. Virol.* 2006. V. 87. № 9. P. 2731–2740.
- Kaftanova A.S., Kiselev N.A., Novikov V.K., Atabekov J.G. // *Virology.* 1975. V. 65. P. 283–287.
- Kiseleva O.I., Yaminsky I.V., Karpova O.V., Rodionova N.P., Kozlovsky S.V., Arkhipenko M.V., Atabekov J.G. // *J. Mol. Biol.* 2003. V. 332. № 2. P. 321–325.
- Никитин Н.А., Сушко А.Д., Архипенко М.В., Родионова Н.П., Карпова О.В., Яминский И.В. // *Коллоидн. журн.* 2011. Т. 73. № 4. С. 512–519.
- Карпова О.В., Архипенко М.В., Заякина О.В., Никитин Н.А., Киселева О.И., Козловский С.В., Родионова Н.П., Атабеков И.Г. // *Молекуляр. биология.* 2006. Т. 40. № 4. С. 703–710.
- Rodionova N.P., Karpova O.V., Kozlovsky S.V., Zayakina O.V., Arkhipenko M.V., Atabekov J.G. // *J. Mol. Biol.* 2003. V. 333. № 3. P. 565–572.
- Zayakina O., Arkhipenko M., Kozlovsky S., Nikitin N., Smirnov A., Susi P., Rodionova N., Karpova O., Atabekov J. // *Mol. Plant. Pathol.* 2008. V. 9. № 1. P. 37–44.
- Butler P.J. // *J. Gen. Virol.* 1984. V. 65. № 2. P. 253–279.
- Choi Y.G., Rao A.L. // *J. Virol.* 2003. V. 77. № 18. P. 9750–9757.
- Miller E.D., Plante C.A., Kim K.H., Brown J.W., Hemenway C. // *J. Mol. Biol.* 1998. V. 284. № 3. P. 591–608.
- Qu F., Morris T.J. // *J. Virol.* 1997. V. 71. № 2. P. 1428–1435.
- Sit T.L., Leclerc D., AbouHaidar M.G. // *Virology.* 1994. V. 199. № 1. P. 238–242.
- Kwon S.J., Park M.R., Kim K.W., Plante C.A., Hemenway C.L., Kim K.H. // *Virology.* 2005. V. 334. № 1. P. 83–97.
- Lough T.J., Lee R.H., Emerson S.J., Forster R.L., Lucas W.J. // *Virology.* 2006. V. 351. № 2. P. 455–465.
- Lee Y.F., Nomoto A., Detjen B.M., Wimmer E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977. V. 74. № 1. P. 59–63.
- Yogo Y., Wimmer E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1972. V. 69. № 7. P. 1877–1882.
- Abouhaidar M.G., Bancroft J.B. // *Virology.* 1980. V. 107. № 1. P. 202–207.

УДК 577.1:547.96

Транскрипционный фактор DLX5 как новая мишень для перспективных противоопухолевых препаратов

Р. А. Тимахов^{1,2,3*}, П. О. Федичев¹, А. А. Винник¹, J. R. Testa³, О. О. Фаворова²¹Квантум Фармасьютикалз, 125171, Москва, ул. Космонавта Волкова, 6А²ГБОУ ВПО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова Минздравсоцразвития РФ, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1³Fox Chase Cancer Center, 333 Cottman Avenue, Philadelphia, USA, 19111

*E-mail: timakhov@gmail.com

Поступила в редакцию 11.05.2011 г.

РЕФЕРАТ На основании анализа кристаллической структуры транскрипционного фактора DLX5 человека из исходной библиотеки, содержащей 10^6 химических соединений, методом молекулярного докинга выбраны малые молекулы – потенциальные лиганды DLX5. Тестирование 14 соединений *in vitro* показало, что наилучшей способностью ингибировать пролиферацию лимфомных клеток мыши, экспрессирующих *Dlx5*, обладает соединение Q12, действие которого сопровождалось снижением экспрессии протоонкогена *c-myc*. Соединение Q12 проявило низкую токсичность на нормальных клетках эпителия яичника человека и на лимфомных клетках мыши, не экспрессирующих *Dlx5*. Это соединение может использоваться для дальнейшей химической оптимизации и разработки высокоэффективных противоопухолевых препаратов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА DLX5, транскрипционный фактор, малые молекулы, онкологические заболевания, молекулярный докинг.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ миРНК – малые интерферирующие РНК; ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция после обратной транскрипции; DLX5/Dlx5 – транскрипционный фактор человека/мыши, кодируемый геном *DLX5/Dlx5* (Distal less homeobox gene 5); K_d – константа связывания (аффинности); NSCLC (non-small cell lung cancer) – немелкоклеточный рак легкого.

ВВЕДЕНИЕ

В современной клинической практике для борьбы с онкологическими заболеваниями используется широкий набор лекарственных средств [1–3]. Однако даже при использовании всех доступных препаратов доля больных, отвечающих на терапию, очень невелика. Это свидетельствует о необходимости разработки новых эффективных адресных методов лечения онкологических заболеваний, основанных на глубоком понимании механизмов опухолевого роста.

Недавние исследования показали, что транскрипционный фактор DLX5 обладает онкогенной активностью. Сверхэкспрессия гена *DLX5* в клетках млекопитающих стимулирует клеточную пролиферацию [4] и наблюдается в клетках карциномы эндометрия, а также немелкоклеточного (NSCLC) и мелкоклеточного рака легкого [5, 6]. Подавление экспрессии *DLX5* с помощью миРНК в раковых клетках мыши и человека приводит к остановке их деления [4, 7]. Новые данные говорят о прямом влиянии DLX5 на экспрессию протоонкогена *c-myc* [8]. Все это позволяет рассматривать DLX5 как перспективную мишень,

для которой могут быть найдены специфические лиганды со свойствами ингибиторов онкогеназа.

Проблему поиска лигандов того или иного белка часто пытаются решать с помощью так называемого высокопроизводительного скрининга [9–13]. Такой скрининг проводят на культуре клеток или на модели *in vitro*, используя ранее подготовленную библиотеку химических соединений. Логистика и стоимость исследований, необходимых для экспериментальной проверки сколько-нибудь значимого количества молекул, во многих случаях запредельно высоки. В силу этих причин в настоящей работе нами использован ранее разработанный алгоритм поиска ингибиторов новых белковых мишеней, основанный на анализе кристаллической структуры белка-мишени [14]. В основе алгоритма лежит молекулярный докинг химических соединений на известную трехмерную модель белка-мишени, определяющий вероятное положение химического соединения в лигандсвязывающем центре белка, а расчет молекулярной динамики применяется для уточнения энергии связывания лучших соединений. Как показывают наши и многие другие исследования [14–19], именно такой многоуровневый подход

эффективен и позволяет значительно сократить количество проводимых экспериментов. В нашем случае он позволил найти несколько лигандов транскрипционного фактора DLX5, перспективных для терапии онкологических заболеваний.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Подготовка лигандов и молекулярный докинг

Для оптимизации времени вычислительного скрининга библиотека компании ENAMINE, состоящая из 10⁶ соединений, была кластеризована с использованием содержащегося в пакете программ QUANTUM алгоритма Джарвиса–Патрика [20, 21] с ускорением [22], Мерой схожести молекул выбрана так называемая метрика Танимото, рассчитанная с помощью Daylight фингерпринтов молекул [23]. Параметры кластеризации выбирали таким образом, чтобы каждый кластер состоял в среднем из примерно 10 родственных структур, а общее количество некластеризованных молекул не превышало 20% от исходного количества соединений. Соединения, представляющие собой центроиды кластеров, были выбраны для дальнейшего скрининга. Для увеличения скорости молекулярного докинга из всей библиотеки центроидов отобрали молекулы с наименьшей молекулярной массой. Все выбранные соединения были извлечены из поставляемых ENAMINE sdf-файлов и обработаны в пакетном режиме. Дополнительного обогащения библиотеки молекулами, активными в отношении онкомишеней, или другими способами не проводили. Типизацию белка, лигандов и скрининг *in silico* осуществляли с помощью соответствующих инструментов из пакета QUANTUM.

Программа предсказывает константы связывания (аффинности, K_d) малых молекул с белком-мишенью с точностью около одного порядка путем оценки их межмолекулярных взаимодействий, используя точные модели атомных сил в водном окружении [14, 24–26]. При расчетах использовали иерархию физических моделей молекулярных взаимодействий. Для первоначального нахождения положения лиганда в активном центре белка и оценки энергии связывания белок-лигандного комплекса производили докинг лиганда на жесткую структуру белка, а затем результаты уточняли на модели гибкого белка. Для оценки потенциальной энергии взаимодействия применяли модифицированную модель меж- и внутримолекулярных взаимодействий AMBER/GAFF [27]. Свободную энергию оценивали с помощью линейной модели взаимодействия [28]. Водное окружение моделировали с использованием модифицированной обобщенной модели Борна [25]. Алгоритм описан ранее в статье [14], где при-

менялся для поиска ингибиторов белок-белковых взаимодействий.

Молекулярный докинг молекул из исходной библиотеки соединений производили на жесткую структуру белка DLX5 2DJN, взятую из базы Protein Data Bank (PDB) [29]. Выделенная для молекулярного докинга область на трехмерной структуре имела размер 2 x 2 x 2 нм. Лиганды с наилучшими предсказанными энергиями связывания были пересчитаны в модели с полностью подвижным белком [14, 15]. Чтобы убедиться, что обнаруженные молекулы не были описаны ранее, проверяли, не представлены ли эти соединения и/или их аналоги в базах данных и не упомянуты ли они в обзорах, посвященных известным ингибиторам.

Клеточные культуры

В работе использовали линию 42 Т-клеточной лимфомы Akt2-трансгенных мышей (42-936, 42-577 и 42-588) и линию 72 (wt136), охарактеризованные ранее [30]. Клетки культивировали на среде Iscove's MDM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС). Остальные клеточные линии культивировали в среде RPMI с 10% ЭТС. Все клеточные культуры содержали при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Потенциальные ингибиторы DLX5 (Dlx5) в концентрации 10 мкМ добавляли в среду, содержащую 10⁵ опухолевых клеток, с последующей инкубацией в течение 96 ч при 37°C. Пролиферацию клеток оценивали с помощью набора CellTiter 96 Aqueous One Solution Assay («Promega») в соответствии с протоколом производителя. Каждый опыт повторяли не менее 3 раз.

Выделение РНК и ОТ-ПЦР в реальном времени

РНК выделяли из клеток линии 42 Т-клеточной лимфомы мыши после инкубации с веществом Q12 и DMSO в течение 96 ч с использованием набора RNeasy@ Kit в соответствии с протоколом производителя. ОТ-ПЦР в реальном времени (не менее трех повторов) проводили в специальной службе Фокс-Чейзовского онкологического центра. Пробы для оценки экспрессии генов *c-myc*, *Dlx5* и *Tbp* синтезированы фирмой «Applied Biosystems».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для поиска новых молекул-лигандов DLX5 использовали программный комплекс QUANTUM, основанный на анализе кристаллической структуры белка [14, 24–26]. Этот подход позволяет не только идентифицировать молекулы, потенциально связывающиеся с данным белком, но и минимизировать количество ложноположительных результатов, когда молекулы с предсказанной *in silico* высокой энергией связывания не проявляют функциональной активности в эксперименте. Поиск был затруднен отсутствием

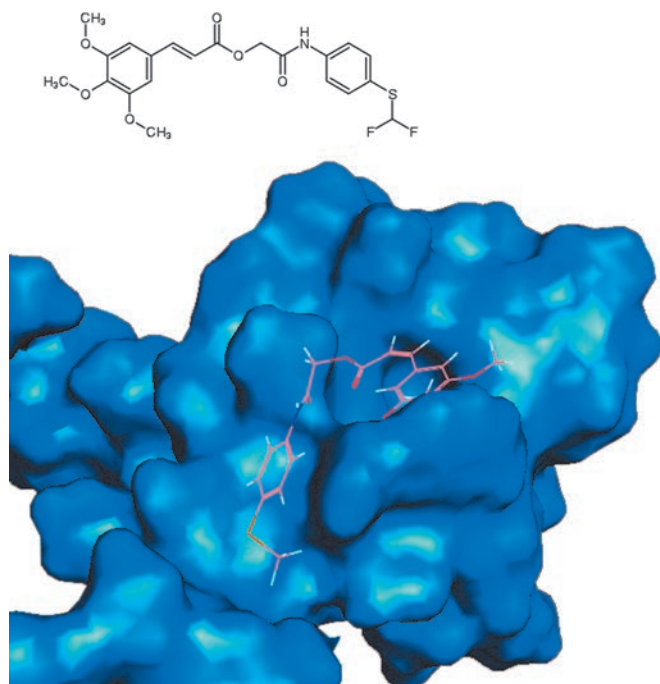


Рис. 1. Молекулярный докинг одного из отобранных для дальнейших исследований соединений: химическая структура и расположение в активном сайте транскрипционного фактора DLX5.

предварительной информации о связывании известных соединений с белком DLX5, поэтому исследования проводили «вслепую». Лучшие молекулы и все их структурные аналоги из исходной библиотеки ENAMINE были отсортированы по величине предсказанной энергии связывания. По результатам молекулярного докинга отобрали 100 лигандов, из них 14 с наилучшей предсказанной энергией связывания белка DLX5 были заказаны и синтезированы в компании ENAMINE, а затем проверены на культурах клеток. Пример молекулярного докинга с активным центром DLX5 одного из этих лигандов показан на рис. 1.

В качестве модели для проверки специфической активности выбранных лигандов использовали клетки ранее охарактеризованной линии 42 Т-клеточной лимфомы Akt2-трансгенных мышей [4, 30]. Эти клетки несут клональную хромосомную перестройку – инверсию хромосомы 6, которая приводит к транслокации гена *Dlx5* в область, находящуюся под контролем Т-клеточного энхансера, и к сверхэкспрессии белка *Dlx5*. Лимфомные клетки 42-936 инкубировали с каждым из 14 выбранных лигандов DLX5 и оценивали влияние последних на пролиферацию. Как видно из рис. 2А, лиганды с разной эффективностью влияют на пролиферацию лимфомных клеток, лучшую ингибирующую активность проявили соединения под номерами Q8, Q12, Q9 и Q13. Возможное неспецифическое цитотоксическое действие отобранных соединений

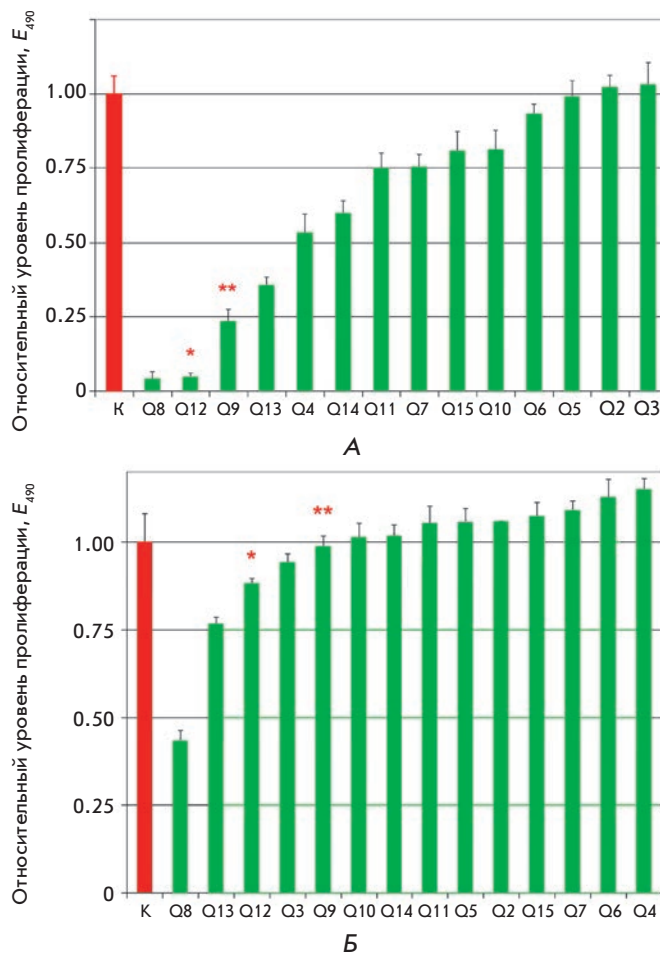


Рис. 2. Экспериментальная оценка свойств 14 соединений, для которых предсказана высокая энергия связывания с трехмерной структурой DLX5: их эффективность, оцениваемая по влиянию на пролиферацию *Dlx5*-позитивных клеток лимфомы мышей 42-936 (А), и цитотоксичность, определяемая по влиянию на пролиферацию нормальных клеток эпителия яичника человека (Б). К – уровень пролиферации клеток в контроле. Звездочками отмечены столбцы, отражающие эффект наиболее перспективных соединений Q12 (*) и Q9 (**).

проверяли на нормальных клетках эпителия яичника человека, не экспрессирующих *DLX5* (рис. 2Б). При сравнении с контролем видно, что большинство молекул-лигандов, за исключением соединений Q8 и Q13, не проявляют значительной цитотоксичности. Поскольку Q8 и Q13 обладают цитотоксическим эффектом, их исключили из дальнейшего рассмотрения. Вещества Q12 и Q9 выбрали для дальнейшего изучения как наиболее перспективные.

Для исключения возможности неспецифического влияния Q12 и Q9 на клетки лимфоидного ряда их действие проверяли на клетках линии 72 Т-клеточной лимфомы Akt2-трансгенных мышей,

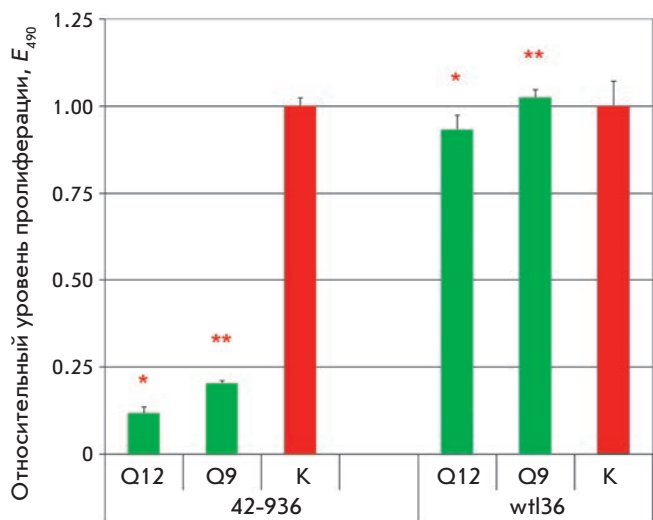


Рис. 3. Селективность соединений Q9 и Q12 на клетках лимфомы мышей. Левая панель: влияние на пролиферацию Dlx5-экспрессирующих лимфомных клеток 42-936. Правая панель: влияние на пролиферацию лимфомных клеток wtf36, не экспрессирующих Dlx5. Остальные обозначения как на рис. 2.

не экспрессирующих *Dlx5* (рис. 3). Клетки линии 72 содержат хромосомную перестройку другого типа – транслокацию между хромосомами 14 и 15 (t(14;15)), которая приводит к повышенной экспрессии протоонкогена *c-myc* [30]. На рис. 4 приведены также результаты влияния соединения Q12 на пролиферацию еще двух подтипов лимфомных клеток, экспрессирующих *Dlx5* – 42-577 и 42-588, а также на пролиферацию лимфомных клеток Jurkat и Molt16 человека, в которых не экспрессируется *DLX5*. Из данных, представленных на рис. 3 и 4, можно сделать общий вывод, что соединения Q9 и Q12 не влияют на пролиферацию клеток, не экспрессирующих *Dlx5*, однако высокоэффективно подавляют пролиферацию клеток, в которых экспрессируется этот фактор.

Известно, что транскрипционный фактор *DLX5* может прямо регулировать экспрессию протоонкогена *c-myc* [8, 30]. Методом ОТ-ПЦР в реальном времени исследовано влияние Q12 на экспрессию *c-myc* в лимфомных клетках 42-936, экспрессирующих *Dlx5*. На рис. 5 представлены уровни мРНК *c-myc* относительно эндогенного контроля – мРНК ТАТА-связывающего белка (Тbp) или мРНК *Dlx5*, а также мРНК *Dlx5* относительно мРНК Тbp в присутствии 10 мкМ Q12 и без добавления последнего. Видно, что экспрессия *c-myc* значительно снижается под действием Q12, тогда как экспрессия *Dlx5* при этом не меняется. Эти результаты согласуются с представлением об ингибиторном эффекте лиганда Q12 на транскрипционную активность фактора *Dlx5*.

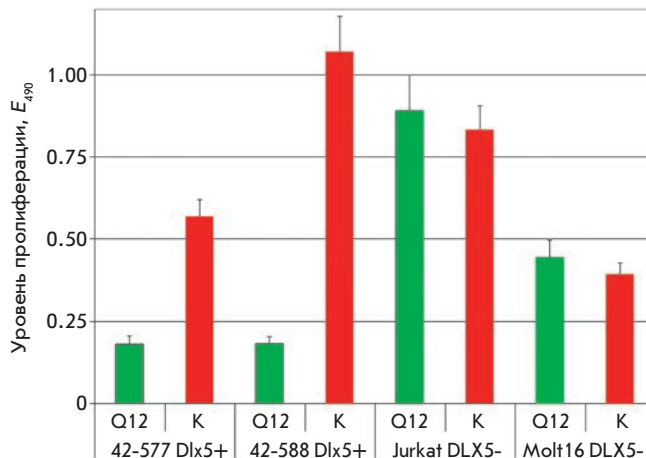


Рис. 4. Селективность соединения Q12 на клетках лимфомы человека. Слева – пролиферация Dlx5-позитивных лимфомных клеток мыши 42-577 и 42-588. Справа – пролиферация лимфомных клеток человека Jurkat и Molt16, не экспрессирующих *DLX5*. Остальные обозначения как на рис. 2.

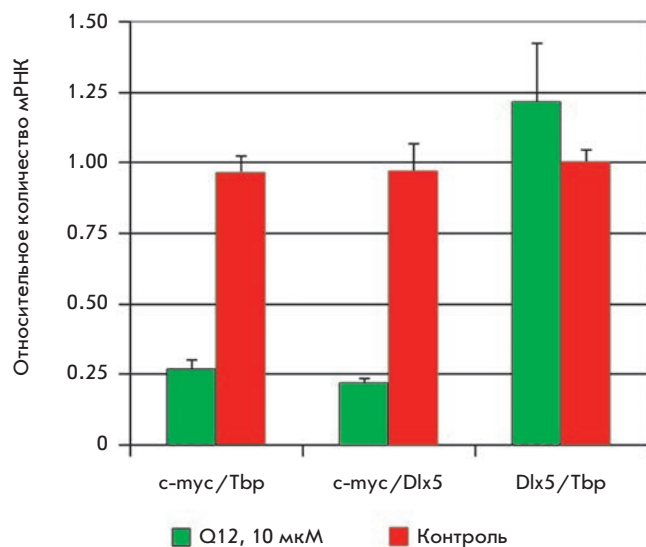


Рис. 5. ОТ-ПЦР в реальном времени. Оценка экспрессии *c-myc* и *Dlx5* в лимфомных клетках мыши 42-936, культивируемых в присутствии 10 мкМ Q12, по уровню их мРНК. Тbp – ТАТА-связывающий белок.

Хотя эти данные нуждаются в проверке на большем числе клеточных линий, привлекательно уже по результатам этой работы сделать предварительный вывод о специфичности связывания лигандом Q12 транскрипционного фактора *DLX5*.

Использованные в нашей работе подходы позволили экспериментально выявить наиболее активные ингибиторы *Dlx5* (*DLX5*) из числа проверенных. В дальнейшем планируется оптимизировать структуру найденных соединений по таким параметрам,

как повышение эффективности, уменьшение возможной неспецифической токсичности и увеличение метаболической стабильности. Следующий этап нашей работы предполагает оценку активности и токсичности оптимизированных соединений *in vivo*, а также прямые измерения их K_d .

ВЫВОДЫ

С целью выяснения принципиальной возможности использования транскрипционного фактора DLX5 в качестве мишени для противоопухолевых средств и создания лекарств, способных подавлять развитие некоторых типов опухолей человека (Т-лимфом, рака легкого и яичников), проведен поиск специфических лигандов фактора DLX5 на основе анализа его кристаллической структуры. Показано, что более 50% отобранных методом молекулярного докинга соединений обладают способностью в микромолярных концентрациях ингибировать пролиферацию экспрессирующих *Dlx5* клеток мыши. При этом многие молекулы, выбранные на основе структуры DLX5, не влияют на клетки других типов, не экспрессирующие этот транскрипционный фактор, что служит доказатель-

ством специфичности отобранных нами химических соединений. Наилучшими по соотношению параметров, характеризующих эффективность и отсутствие неспецифической цитотоксичности, оказались соединения Q12 и Q9. Наблюдаемое снижение экспрессии *c-тус* под действием Q12 свидетельствует об ингибиторном эффекте этого лиганда на транскрипционную активность фактора Dlx5. Найденные нами соединения – первые описанные низкомолекулярные лиганды DLX5, которые могут использоваться для последующей химической оптимизации и разработки высокоэффективных противоопухолевых средств. ●

Работа выполнена в рамках межинститутского сотрудничества между Российским государственным медицинским университетом (кафедра молекулярной биологии и медицинской биотехнологии) и Фокс-Чейзовским онкологическим центром в сотрудничестве с компанией Квантум Фармасьютикалз. Авторы выражают благодарность Е.Г. Гетманцеву и Л.И. Меньшикову за помощь в проведении расчетов и плодотворные обсуждения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Albain K.S., Nag S.M., Calderillo-Ruiz G., Jordaan J.P., Llobart A.C., Pluzanska A., Rolski J., Melemed A.S., Reyes-Vidal J.M., Sekhon J.S., et al. // *J. Clin. Oncol.* 2008. V. 26. P. 3950–3957.
- Shepherd F.A., Pereira J.R. // *N. Engl. J. Med.* 2005. V. 353. P. 123–132.
- Kris M.G., Natale R.B., Herbst R.S., Lynch Jr. T.J., Prager D., Belani C.P., Schiller J.H., Kelly K., Spiridonidis H., Sandler A., et al. // *JAMA.* 2003. V. 290. № 16. P. 2149–2158.
- Tan Y., Timakhov R.A., Rao M., Altomare D.A., Xu J., Liu Z., Gao Q., Jhanwar S.C., Di Cristofano A., Wiest D.L., et al. // *Cancer Res.* 2008. V. 68. № 5. P. 1296–1302.
- Pedersen N., Mortensen S., Sorensen S.B., Pedersen M.W., Rieneck K., Bovin L.F., Poulsen H.S. // *Cancer Res.* 2003. V. 63. № 8. P. 1943–1953.
- Maxwell G.L., Chandramouli G.V.R., Dainty L., Litz T.J., Berchuck A., Barrett J.C., Risinger J.I. // *Clin. Cancer Res.* 2005. V. 11. P. 4056–4066.
- Kato T., Sato N., Takano A., Miyamoto M., Nishimura H., Tsuchiya E., Kondo S., Nakamura Y., Daigo Y. // *Clin. Cancer Res.* 2008. V. 14. P. 2363–2370.
- Xu J., Testa J.R. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. P. 20593–20601.
- Broach J.R., Thorner J. // *Nature.* 1996. V. 384. P. 14–16.
- Young K., Lin S., Sun L., Lee E., Modi M., Hellings S., Husbands M., Ozenberger B., Franco R. // *Nat. Biotechnol.* 1998. V. 16. P. 946–950.
- Hamasaki K., Rando R.R. // *Anal. Biochem.* 1998. V. 261. P. 183–190.
- Moore K.J., Turconi S., Miles-Williams A., Djaballah H., Hurskainen P. // *J. Biomol. Screen.* 1999. V. 4. P. 205–214.
- Dunn D., Orłowski M., McCoy P., Gastgeb F., Appell K. // *J. Biomol. Screen.* 2000. V. 5. P. 177–188.
- Joce C., Stahl J.A., Shridhar M., Hutchinson M.R., Watkins L.R., Fedichev P.O., Yin H. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010. V. 20. № 18. P. 5411–5413.
- Okimoto N., Futatsugi N., Fuji H., Suenaga A., Morimoto G., Yanai R., Ohno Y., Narumi T., Taiji M. // *PLoS Comput. Biol.* 2009. V. 5. № 10. P. 1–13.
- Doman T., Huo S., Wang J., Cieplak P., Kollman P.A., Kuntz I.D. // *J. Med. Chem.* 2002. V. 45. P. 1412–1419.
- Masukawa K.M., Kollman P.A., Kuntz I.D. // *J. Med. Chem.* 2003. V. 46. P. 5628–5637.
- Kuhn B., Gerber P., Schulz-Gasch T., Stahl M.J. // *J. Med. Chem.* 2005. V. 48. P. 4040–4048.
- Ferrara P., Curioni A., Vangrevelinghe E., Meyer T., Mordasini T. // *J. Chem. Inf. Model.* 2006. V. 46. P. 254–263.
- Jarvis R.A., Patrick E.A. // *IEEE Trans. Comput.* 1973. V. 22. № 11. P. 1025–1034.
- Willett P. *Similarity and Clustering in Chemical Information Systems*. N.Y. USA: John Wiley & Sons, Inc., 1987. 266 p.
- Li W. // *J. Chem. Inf. Model.* 2006. V. 46. № 5. P. 1919–1923.
- Flower D.R. // *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 1998. V. 38. P. 379–386.
- Fedichev P.O., Men'shikov L.I. // *Arxiv preprint.* 2006. arXiv:cond-mat/0601129v3
- Fedichev P.O., Getmantsev E.G., Menshikov L.I. // *J. Comput. Chem.* 2011. V. 32. № 7. P. 1368–1376.
- Men'shikov L.I., Fedichev P.O. // *Rus. J. Phys. Chem.* 2011. V. 85. № 5. P. 906–908.
- Case D.A., Darden T.A., Cheatham III. T.E., Simmerling C.L., Wang J., Duke R.E., Luo R., Walker R.C., Zhang W., Merz K.M., et al. // *AMBER 11.* 2010. University of California, San Francisco.
- Hansson T., Marelus J., Åqvist J. // *J. COMP-AID MOL DES.* 1996. V. 12. P. 27–35.
- Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E. // *Nucl. Acids Res.* 2000. V. 28. P. 235–242.
- Timakhov R.A., Tan Y., Rao M., Liu Z., Altomare D.A., Pei J., Wiest D.L., Favorova O.O., Knepper J.E., Testa J.R. // *Genes Chromosomes Cancer.* 2009. V. 48. № 9. P. 786–794.

УДК 575.176, 575.174.2, 612.858.4

Оценка гаплотипического разнообразия и реконструкция предкового гаплотипа, ассоциированного с мутацией с.35delG гена *GJB2* (Cx26), в популяциях Волго-Уральского региона

Л. У. Джемилева^{1*}, О. Л. Посух², Н. А. Барашков³, С. А. Федорова³, Ф. М. Терютин³, В. Л. Ахметова¹, И. М. Хидиятова¹, Р. И. Хусаинова¹, С. Л. Лобов¹, Э. К. Хуснутдинова¹

¹Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, 450054, Уфа, просп. Октября, 71

²Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, 630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 10

³Учреждение Российской академии медицинских наук Якутский научный центр комплексных медицинских проблем Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, 677010, Якутск, Сергеляхское шоссе, 4

*E-mail: dzhemilev@anrb.ru

Поступила в редакцию 23.03.2011 г.

РЕФЕРАТ Наибольший вклад в генетически обусловленную потерю слуха вносят мутации гена *GJB2* (Cx26). Спектр и распространенность отдельных мутаций гена *GJB2* специфичны для популяций разной этнической принадлежности. Показано происхождение ряда мутаций гена *GJB2* от предковой хромосомы-основателя, ориентировочно оценен их «возраст» и очерчены предположительные регионы их возникновения. Представлены результаты анализа частот гетерозиготного носительства мажорной в странах Европы мутации гена *GJB2* – с.35delG у 2308 здоровых индивидов из 18 различных этнических популяций Евразии: башкиры, татары, чувашаи, удмурты, коми-пермяки, мордва, русские (Волго-Уральский регион), белорусы, украинцы (Восточная Европа), абхазы, аварцы, черкесы, ингуши (Кавказ), казахи, узбеки, уйгуры (Центральная Азия), якуты, алтайцы (Сибирь). Характер распространения мутации с.35delG в изученных этнических группах может быть дополнительным свидетельством предполагаемой роли эффекта основателя в происхождении и распространении этой мутации в популяциях мира. Гаплотипический анализ хромосом с мутацией с.35delG, выявленной у больных с наследственной несиндромной нейросенсорной тугоухостью/глухотой ($N = 112$) и в популяционных выборках ($N = 358$), позволил реконструировать предковый гаплотип с этой мутацией, установить единство происхождения большинства исследованных мутантных хромосом и датировать время экспансии (11800 лет) носителей мутации с.35delG на территории Волго-Уральского региона.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА наследственная несиндромная нейросенсорная тугоухость/глухота, ген *GJB2* (Cx26), мутация с.35delG, предковый гаплотип, популяции Волго-Уральского региона.

ВВЕДЕНИЕ

Врожденная глухота – одно из частых заболеваний человека, регистрируемое у одного из 1000 новорожденных детей. В вопросах этиологии и патогенеза заболевания остается много неясного, но считается, что примерно в половине всех случаев врожденной глухоты имеют место генетические нарушения [1].

Наследственные формы врожденного нарушения слуха характеризуются клиническим полиморфиз-

мом и генетической гетерогенностью. В ядерном геноме картировано около 114 локусов и идентифицировано 55 генов, мутации в которых в той или иной степени приводят к нарушениям слуха. Около 80% всех случаев несиндромной наследственной глухоты приходится на аутосомно-рецессивные формы, 15–20% – на аутосомно-доминантные, а на сцепленную с X-хромосомой и митохондриальные формы глухоты – около 1% [2].

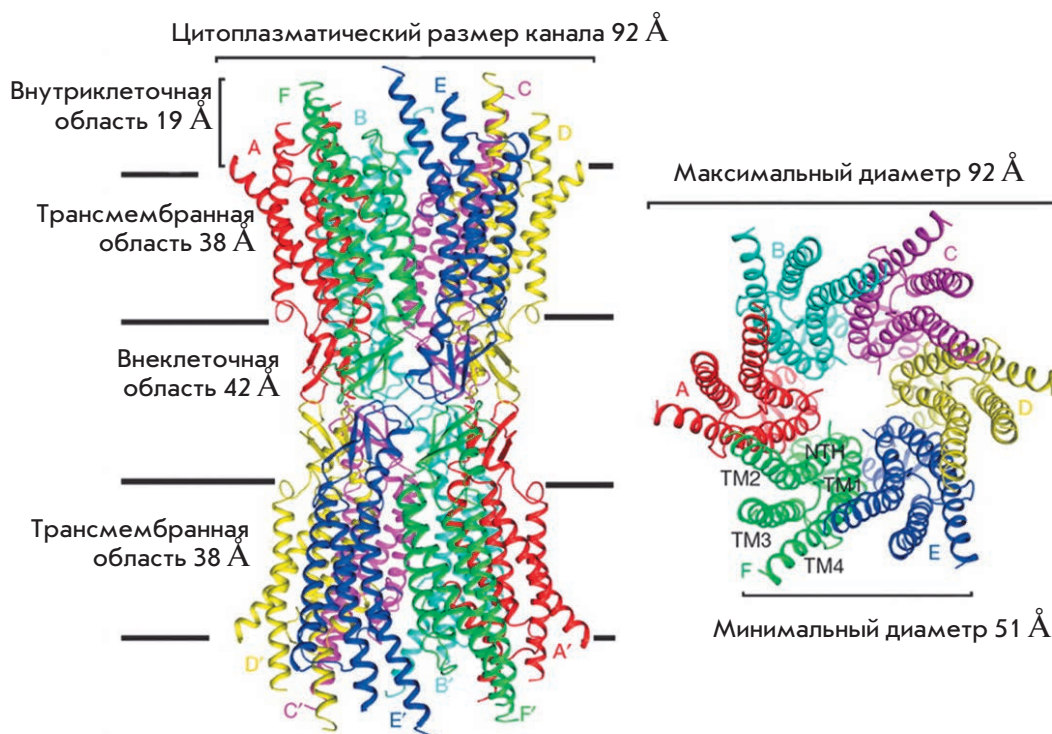


Рис. 1. Структура межклеточного канала, образованного молекулами коннексина 26. А, В, С, D, F, E и А', В', С', D', F', E' – молекулы коннексина 26 в коннексах соседних клеток; ТМ1–4 – трансмембранные сегменты белка Сх26; NTH – N-концевая спираль белка Сх26. Рисунок адаптирован из [3] с разрешения Macmillan Publishers Ltd.

Наиболее частая причина несиндромной ауто-сомно-рецессивной глухоты у человека – мутации в гене *GJB2* (gap junction $\beta 2$, субъединица $\beta 2$ белка щелевых контактов), локализованном в области 13q11–q13 и кодирующем коннексин 26 (Cx26) – трансмембранный белок, участвующий в образовании коннексонов. Коннексоны – это структуры, состоящие из шести белковых субъединиц, формирующих межклеточные каналы, посредством которых обеспечивается полноценный ионный обмен между соседними клетками, что, в свою очередь, способствует поддержанию гомеостаза эндолимфы в тканях улитки. Недавно опубликованы сведения о тонкой структуре межклеточных каналов, образованных коннексином 26 (рис. 1) [3]. При дефектах коннексина 26 в тканях внутреннего уха необратимо нарушается работа межклеточных каналов и не происходит восстановления гомеостаза эндолимфы, необходимого для нормального звуковосприятия [4].

В настоящее время в гене *GJB2* уже описано более 150 патогенных мутаций (в основном, рецессивных), ряд полиморфизмов и однонуклеотидных замен, роль которых в патогенезе потери слуха пока неясна [2]. Спектр и частоты мутаций гена *GJB2* характеризуются существенными межпопуляционными различиями. Установлена расовая и/или этническая специфичность распространенности ряда мутаций гена *GJB2*, обусловленная, в ряде случаев, эффектом основателя, а также, возможно, географической и социальной изоляцией некоторых популяций. Уда-

лось показать происхождение ряда мутаций гена *GJB2* от предковой хромосомы-основателя, получены ориентировочные оценки «возраста» мутаций и очерчены предполагаемые регионы их возникновения [5–10]. Наиболее распространенная в Европе мутация с.35delG (p.Gly12Valfsx1) впервые возникла, по разным оценкам, от 10000 до 14000 лет назад на территории Ближнего Востока или Средиземноморья (возможно, на территории современной Греции) [10–12] и с миграциями неолитической популяции *Homo sapiens* распространилась в Европе [6]. Анализ гаплотипов хромосом, несущих другую мутацию – с.235delC (p.Leu79Cysfsx3), в популяциях Японии, Кореи, Китая и Монголии позволил выдвинуть гипотезу об эффекте основателя в происхождении и распространении этой мутации на территории Восточной Азии, оценить ее «возраст» (~11500 лет) и предположительное возникновение в регионе озера Байкал, откуда путем последовательных миграций она распространилась по территории Азии [7]. Оценен также «возраст» наиболее распространенной в Индии мутации с.71G > A (p.Trp24X) (~7880 лет) [8]. Показана этническая специфичность мутации с.167delT (p.Leu56Argfsx26) для популяций евреев ашкенази [5] и мутации с.427C > T (p.Arg143Trp) для некоторых популяций Западной Африки [13, 14].

В России изучению наследственных форм глухоты посвящены работы ряда исследовательских групп [15–32]. В большинстве случаев рассматриваются генетико-эпидемиологические и клинико-генетические особен-

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Таблица 1. Частоты гетерозиготного носительства мутации с.35delG в 18 этнических группах, проживающих на территории Евразии

Популяция	Лингвистическая классификация (языковая семья/ группа)	Регион	N	Гетерозиготные носители мутации с.35delG /число протестированных индивидов (частота гетерозиготного носительства)
Восточная Европа				
Белорусы	Индоевропейская/ Славянская	Республика Беларусь (дисперсная выборка)	97	6/97 (0.062)
Украинцы	Индоевропейская/ Славянская	Харьковская, Полтавская области Украины	90	3/90 (0.033)
Волго-Уральский регион				
Русские	Индоевропейская/ Славянская	Екатеринбургская область, РФ	92	2/92 (0.022)
Башкиры	Алтайская/ Тюркская	Баймакский, Бурзянский, Абзелиловский, Кугарчинский, Салаватский, Архангельский районы Республики Башкортостан, РФ	400	1/400 (0.003)
Татары	Алтайская/ Тюркская	Альметьевский и Елабужский районы Республики Татарстан, РФ	96	1/96 (0.010)
Чуваши	Алтайская/ Тюркская	Моргаушский район Республики Чувашия, РФ	100	0/100
Мордва	Уральская/ Финно-угорская	Старошайгинский район Республики Мордовия, РФ	80	5/80 (0.062)
Удмурты	Уральская/ Финно-угорская	Малопургинский район Республики Удмуртия, Татышлинский район Республики Башкортостан, РФ	80	3/80 (0.037)
Коми-пермяки	Уральская/ Финно-угорская	Качаевский район Коми-Пермяцкого автономного округа, РФ	80	0/80
Средняя Азия				
Казахи	Алтайская/ Тюркская	Алма-Атинская, Кызылординская области, Абайский район Казахстана	240	2/240 (0.008)
Уйгуры	Алтайская/ Тюркская	Алма-Атинская область Казахстана	116	1/116 (0.009)
Узбеки	Алтайская/ Тюркская	Республика Узбекистан (дисперсная выборка)	60	0/60
Кавказ				
Абхазы	Северо-кавказская/ Адыго-абхазская	Абхазия, Грузия (дисперсная выборка)	80	3/80 (0.038)
Аварцы	Северо-кавказская / Дагестанская	Гумбетовский район Республики Дагестан, РФ	60	0/60
Черкесы	Северо-кавказская/ Адыго-абхазская	Карачаево-Черкесская Республика, РФ	80	1/80 (0.013)
Ингуши	Северо-кавказская / Нахская	Назрановский район Республики Ингушетия, РФ	80	0/80
Сибирь				
Алтайцы	Алтайская/ Тюркская	Республика Алтай, РФ	230	0/230
Якуты	Алтайская/ Тюркская	Мегино-Кангаласский, Амгинский, Чурапчинский, Таттинский, Верхневиллюйский, Вилюйский, Нюрбинский, Сунтарский улусы (районы) Республики Саха (Якутия), РФ	247	1/247 (0.004)

ности наследственных форм тугоухости, ряд работ посвящен молекулярно-генетическому анализу гена *GJB2* или его отдельных мутаций [17–21, 25–30]. В некоторых работах получены данные о специфичности спектра и частоты отдельных мутаций гена *GJB2* в зависимости от региона исследования. Так, например, наиболее частые мутации в сибирских популяциях (якуты и алтайцы) – IVS1 + 1G > A [27] и с.235delC [25] соответственно, а в популяциях Волго-Уральского региона, как и в целом в европейской части континента, преобладает мутация с.35delG [18–22, 28]. Локальные различия в частотах гетерозиготного носительства мутации с.35delG, вероятно, связаны с генетической историей отдельных этносов, с факторами популяционной динамики и миграционными путями носителей с.35delG. Имеющиеся информативные данные о вкладе мутаций гена *GJB2* в развитие патологии у больных несиндромной нейросенсорной тугоухостью/глухотой (НСНТ), проживающих в Волго-Уральском регионе, и популяционные данные о гетерозиготном носительстве наиболее значимой рецессивной мутации с.35delG позволили адекватно оценить гаплотипическое разнообразие хромосом с мутацией с.35delG, реконструировать возможный предковый гаплотип, сцепленный с этой мутацией, и оценить время ее возникновения на территории Волго-Уральского региона, являющегося восточной границей ареала распространения мутации с.35delG.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалом для гаплотипического анализа и оценки «возраста» с.35delG гена *GJB2* послужили образцы ДНК 56 (112 хромосом) больных НСНТ, проживающих на территории Волго-Уральского региона, у которых мутация с.35delG идентифицирована в гомозиготном состоянии (32 русских, 10 татар, 1 башкир, 4 украинца, 2 армянина, 7 метисов). В контрольную группу включены 179 (358 хромосом) здоровых индивидов из трех этногеографических групп русских ($N = 86$), татар ($N = 62$) и башкир ($N = 31$), у которых данная мутация не выявлена.

Для анализа частоты гетерозиготного носительства с.35delG использованы 2308 образцов ДНК, полученных от здоровых неродственных индивидов – представителей различных этносов Волго-Уральского региона, Средней Азии, Северного Кавказа, Восточной Европы и Сибири, принадлежащих к четырем языковым семьям (табл. 1).

Образцы крови получены во время экспедиционных выездов в 2000–2010 гг. после информированного письменного согласия участников исследования. Геномную ДНК выделяли из лейкоцитов свежей или замороженной консервированной крови методом последовательной фенол-хлороформной экстракции.

Данная научно-исследовательская работа одобрена локальным этическим комитетом по биомедицинской этике при ИБГ УНЦ РАН (Уфа).

Скрининг мутации с.35delG в гене *GJB2*

Скрининг мутации с.35delG в гене *GJB2* проводили с помощью аллель-специфической амплификации фрагментов кодирующего района *GJB2* с использованием праймеров, приведенных в табл. 2. Результаты визуализировали при помощи вертикального электрофореза в 10% полиакриламидном геле (ПААГ) с последующим окрашиванием раствором этидия бромида стандартной концентрации и просмотра в ультрафиолетовом свете.

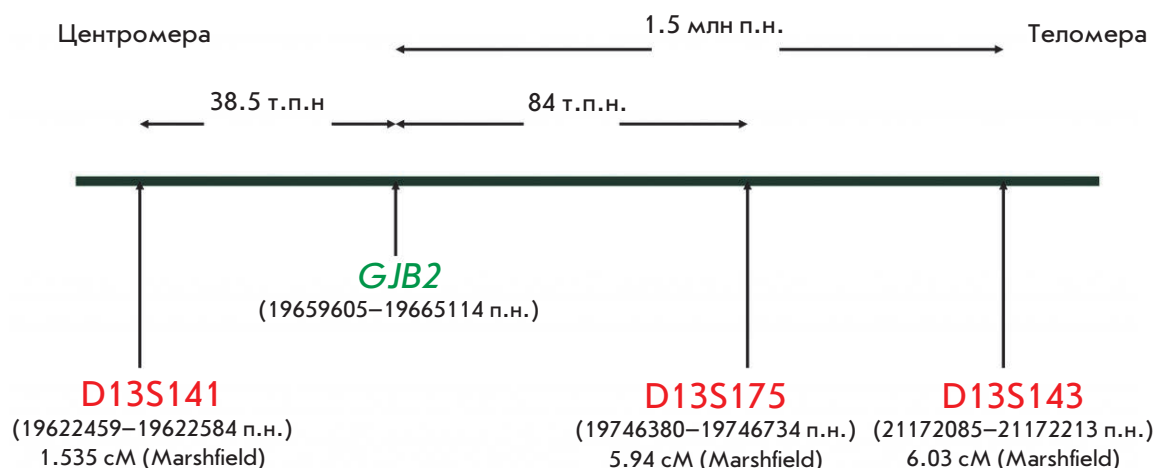
Анализ гаплотипов и оценка «возраста» мутации с.35delG

Для анализа гаплотипов и оценки «возраста» мутации с.35delG в гене *GJB2* использовали три высокополиморфных микросателлитных СА-маркера: D13S175, D13S141 и D13S143 [6, 9, 10, 12, 36], окружающих локус *DFNB1*, содержащий ген *GJB2*. Физическая и генетическая локализация маркеров на хромосоме 13 и генетические расстояния между ними и геном *GJB2* были определены на основании генетической карты сцепления Marshfield (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>). Общая физическая протяженность фланкируемого региона составила ~ 2 млн п.н.

Таблица 2. Праймеры, использованные для амплификации

Локус	Название праймера и нуклеотидная последовательность	Метод детекции	Ссылка
<i>GJB2</i> (13q11–q12)	35delG F-5'-CTTTTCCAGAGCAAACCGCCC-3' 35delG R-5'-TGCTGGTGGAGTGTTTGTTTCAC-3'	Визуализация ПЦР-фрагментов в 10% ПААГ	[15]
D13S141	F- 5'-GTCCTCCCGCCTAGTCTTA-3' R-5'-ACCACGGAGCAAAGAACAGA-3'		[33]
D13S143	F-5'-CTC ATG GGC AGT AAC AAC AAAA-3' R-5'-CTT ATT TCT CTA GGG GCC AGC T-3'		[34]
D13S175	F-5'-TAT TGG ATA CTT GAA TCT GCT G-3' R-5'-TGC ATC ACC TCA CAT AGG TTA-3'		[35]

Рис. 2. Локализация микросателлитных маркеров D13S141, D13S175 и D13S143, фланкирующих ген *GJB2*, на хромосоме 13. Расстояния между геном *GJB2* и маркерами обозначены стрелками.



(рис. 2). Выбор маркеров обусловлен, в первую очередь, стремлением к возможной сопоставимости данных, поскольку ранее эти маркеры уже использовали для оценки «возраста» мутаций в гене *GJB2* в различных популяциях [6, 9, 10, 12, 36].

STR-маркеры генотипировали с помощью ПЦР на программируемом термоциклере фирмы «Eppendorf» с использованием олигонуклеотидных праймеров (табл. 2). Продукты реакции разделяли с помощью вертикального электрофореза (стекла размером 20 × 20 см фирмы «Helicon», Россия) в 10% ПААГ с 5% глицерином. Гели окрашивали ионами серебра.

Неравновесие по сцеплению между аллелями локусов хромосомы 13 рассчитывали по формуле:

$$\delta = (Pd - Pn) / (1 - Pn),$$

где δ – мера неравновесия по сцеплению, Pd – частота ассоциированного аллеля среди хромосом с мутацией, Pn – частота этого же аллеля среди хромосом без мутации [37].

Статистическую значимость различий частот аллелей исследованных маркеров на 112 хромосомах, содержащих с.35delG, и 358 хромосомах без этой мутации оценивали с помощью стандартного критерия χ^2 для двупольной таблицы (пакет приложений программ MedStat).

«Возраст» экспансии гаплотипа-основателя с мутацией с.35delG гена *GJB2* оценивали с использованием подхода «генетических часов» [38], основанного на определении количества поколений (q) с момента появления мутации в популяции до настоящего времени, исходя из соотношения неравновесия по сцеплению полиморфных маркеров, сцепленных с локусом заболевания. «Возраст» экспансии гаплотипа-основателя с мутацией с.35delG рассчитывали по формуле:

$$q = \log[1 - Q / (1 - Pn)] / \log(1 - \Theta),$$

где q – количество поколений с момента появления мутации в популяции, Q – доля мутантных хромосом без гаплотипа-основателя в популяции, Pn – частота аллеля гаплотипа-основателя в популяции, Θ – рекомбинационная фракция. Значение Θ рассчитано по физическому расстоянию маркеров от местоположения мутации исходя из соотношения 1 сМ = 1000 т.п.н.

Величину аллельной ассоциации оценивали по коэффициенту стандартного неравновесия согласно [39]:

$$\Delta St = \frac{p - q}{\sqrt{(p + q)(2 - p - q)}},$$

где p и q – частоты аллелей или гаплотипов нормальной (p) и мутантной (q) хромосомы.

Показатель гаплотипического разнообразия, эквивалентный ожидаемой гетерозиготности, рассчитывали по формуле:

$$h = (1 - \sum x_i^2) N / (N - 1),$$

где x – частота каждого гаплотипа в популяции, N – объем выборки [40].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Во многих популяциях мира основной вклад в развитие несиндромной нейросенсорной тугоухости/глухоты (НСНТ) вносят мутации гена *GJB2*. В большинстве европейских популяций до 40–50% случаев НСНТ обусловлены одной из мажорных рецессивных мутаций этого гена – мутацией с.35delG, выявляемой в гомозиготном или компаунд-гетерозиготном состоянии [41]. В связи с этим во многих работах анализировали частоты гетерозиготного носительства с.35delG в различных популяциях мира. Так, в масштабном исследовании, охватывающем 17 европейских стран,

показано, что средняя частота гетерозиготного носительства мутации с.35delG составляет 1.96% (1/51) с вариацией от 2.86% (1/35) в странах Южной Европы до 1.26% (1/79) в странах Северной Европы [42]. Среди стран Средиземноморья самые высокие частоты гетерозиготного носительства с.35delG наблюдались в Греции (3.5%), в южных регионах Италии (4.0%) и Франции (3.4%) [43]. В результате метаанализа частоты с.35delG более чем у 23000 индивидов из различных популяций, проведенного на основе данных, опубликованных за период с 1998–2008 г., были определены средние региональные частоты с.35delG в европейских (1.89%), американских (1.52%), азиатских (0.64%), африканских (0.64%) популяциях и в Океании (1%), подтвержден градиент снижения частоты с.35delG (от 2.48 до 1.53%) с юга на север в европейских популяциях и с запада на восток (от 1.48 до 0.1%) в азиатских [44].

Частота гетерозиготного носительства мутаций с.35delG

Нами проведен анализ частоты гетерозиготного носительства мутации с.35delG в 18 популяциях России и стран бывшего Советского Союза (табл. 1).

Высокие частоты гетерозиготного носительства с.35delG выявлены в двух восточноевропейских популяциях – у украинцев (3.3%) и белорусов (6.2%). В тюркоязычных популяциях Волго-Уральского региона мутация с.35delG обнаружена с частотами 1.0, 0.3 и 0% – у татар, башкир и чувашей соответственно. Среди финно-угорских популяций Волго-Уральского региона мутация с.35delG представлена с высокой частотой 6.2% у мордвы, 3.7% у удмуртов и отсутствовала у коми-пермяков. Эти флуктуации частоты гетерозиготного носительства с.35delG среди изученных финно-угорских популяций Волго-Уральского региона обусловлены, возможно, специфическими особенностями исторического формирования этих популяций на территории Волго-Уральского региона либо могут быть следствием относительно малых размеров выборок. Ранее высокую частоту с.35delG (4.4%) обнаружили у эстонцев, что стало очевидным исключением для популяций Северной Европы, характеризующихся низкими частотами с.35delG [42]. Эти, а также полученные в других исследованиях данные [15, 20–22, 28, 29] свидетельствуют о существенной вариабельности частоты гетерозиготного носительства с.35delG среди коренных популяций Волго-Уральского региона. Частота гетерозиготного носительства с.35delG, выявленная нами у русских – 2.2%, сопоставима с результатами для русского населения в центральных регионах России [15, 18, 28]. В тюркоязычных популяциях Центральной Азии (казахи, уйгуры, узбеки) мутация с.35delG с низ-

кой частотой обнаружена у казахов (0.8%) и уйгуров (0.9%) и не выявлена у узбеков. В тюркоязычных популяциях Сибири (якуты, алтайцы) мутация с.35delG с относительно низкой частотой (0.4%) выявлена в популяции якутов, но не обнаружена в популяции алтайцев. Регион Северного Кавказа – в прошлом один из значимых коридоров миграций человека по территории Евразии, характеризуется высоким разнообразием населения со сложной историей формирования проживающих там этносов. В популяциях Северного Кавказа (абхазы, аварцы, черкесы, ингуши) мутация с.35delG выявлена только у абхазов (3.8%) и черкесов (1.3%).

Пространственное распределение частоты гетерозиготного носительства мутации с.35delG в популяциях Евразии, полученное на основе собственных данных в совокупности с опубликованными сведениями о частоте с.35delG на территории евразийского континента, доступными на 2010 г. [24], представлено на рис. 3.

Полученные нами данные существенно дополнили картину распределения мутации с.35delG на территории Евразии: европейские регионы России, как и в целом европейская часть континента, характеризуются высокой частотой с.35delG и эта мутация широко распространена также и в полиэтничном населении Волго-Уральского региона. Однако механизмы ее распространенности и время возникновения на территории Волго-Уральского региона остаются неизученными. Для ответа на эти вопросы мы провели гаплотипический анализ хромосом с мутацией с.35delG и без нее с использованием трех высокополиморфных микросателлитных CA-маркеров: D13S175, D13S141 и D13S143 [6, 9, 10, 12, 36], фланкирующих локус DFNB1, содержащий ген *GJB2* (рис. 2).

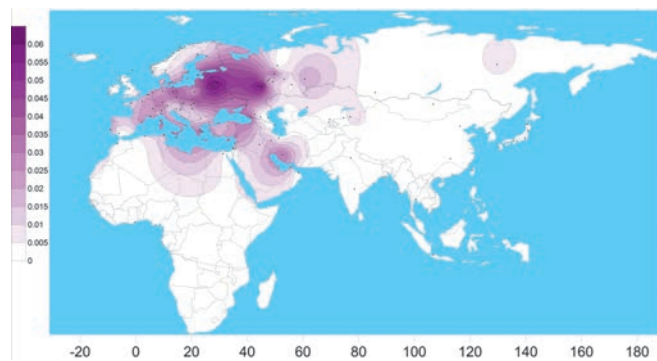


Рис. 3. Пространственное распределение частоты гетерозиготного носительства мутации с.35delG гена *GJB2* в популяциях Евразии (выполнено с использованием программы SURFER 9.0 Golden Software Ink).

Таблица 3. Распределение частот аллелей микросателлитных маркеров D13S141, D13S175 и D13S143 у пациентов с НСНТ (хромосомы с мутацией с.35delG) и в контрольной выборке (нормальные хромосомы)

Аллель, п.н.	Хромосомы с мутацией с.35delG (N = 112)		Нормальные хромосомы (N = 358)		χ^2	p (95% уровень значимости)
	количество хромосом	частота аллеля	количество хромосом	частота аллеля		
D13S141						
113	0	0	10	0.027±0.008	0.3131	0.6
123	26	0.232±0.031	211	0.589±0.026	43.458	0.000
125	84	0.750±0.042	112	0.312±0.024	67.058	0.000
127	2	0.017±0.002	25	0.069±0.013	4.2629	0.045
D13S175						
101	3	0.026±0.012	21	0.058±0.01	1.793	0.300
103	8	0.071±0.021	88	0.245±0.02	15.875	0.000
105	91	0.812±0.036	157	0.438±0.02	47.866	0.000
107	1	0.008±0.007	30	0.083±0.01	7.763	0.005
109	6	0.053±0.024	38	0.106±0.01	2.783	0.100
111	0	0	7	0.019±0.007	2.222	0.150
113	3	0.026±0.01	17	0.047±0.01	0.897	0.064
D13S143						
126	1	0.008±0.007	0	0	3.192	0.04
128	1	0.008±0.007	5	0.013±0.006	0.169	0.65
130	90	0.80±0.048	283	0.79±0.021	0.088	0.81
132	6	0.05±0.026	26	0.07±0.013	0.490	0.54
134	12	0.11±0.016	37	0.10±0.013	0.012	0.89
136	2	0.017±0.021	3	0.008±0.004	0.727	0.55
138	0	0	4	0.011±0.005	3.278	0.05

Частоты аллелей локусов D13S141, D13S175 и D13S143

В табл. 3 приведено распределение частот аллелей микросателлитных маркеров D13S141, D13S175 и D13S143 у больных НСНТ (хромосомы с мутацией с.35delG) и в контрольной выборке (нормальные хромосомы), включающей три этнические группы (русские, татары, башкиры).

В других работах область размером в 2 млн п.н., покрываемая этими тремя маркерами, позволила рассчитать приблизительное число поколений, прошедших после начала экспансии предполагаемого гаплотипа-основателя, включающего мутации гена *GJB2*, в популяциях Индии (мутация p.Trp24X) [8] и Марокко (мутация с.35delG) [9]. Панель из восьми STR-маркеров (D4S189, D13S1316, D13S141, D13S175, D13S1853, D13S143, D13S1275, D13S292) и двух SNP-маркеров использована при датировке «возраста» мутации сайта сплайсинга IVS1 + 1G > A гена *GJB2* в популяции якутов [27]. «Возраст» мутаций с.35delG и с.235delC рассчитывали с использованием шести SNP-маркеров [6, 7]. В более поздних работах по уточнению «возраста» мутации с.35delG в Греции использовали два STR-маркера, D13S175, D13S141, и шесть SNP-маркеров [12].

D13S141. Маркер D13S141 имеет семь аллельных вариантов [9, 12], однако в этнических группах из Волго-Уральского региона их выявлено только четыре. Частота аллеля 123 (D13S141) значимо выше ($\chi^2 = 43.458$; $p = 0.000$) на хромосомах индивидов из контрольной группы – 59%, тогда как у больных НСНТ только 23%. Аллель 125 (D13S141) обнаруживается на мутантных хромосомах с частотой 75%, что значимо выше, чем на нормальных хромосомах (31%) ($\chi^2 = 67.058$; $p = 0.000$), и согласуется с данными о преобладании аллеля 125 (D13S141) на хромосомах с мутацией с.35delG у больных НСНТ из Марокко, Греции, Палестины и Израиля [9, 10, 12, 45].

D13S175. Маркер D13S175 имеет восемь аллельных вариантов [9, 10, 12], из которых в этнических группах из Волго-Уральского региона представлены семь. Аллель 105 (D13S175) на хромосомах с с.35delG обнаруживается с частотой 81.2%, значимо более высокой по сравнению с нормальными хромосомами (43.8%) ($\chi^2 = 47.866$; $p = 0.000$), а аллель 103 (D13S175) значимо чаще обнаруживался на хромосомах индивидов из контрольной группы ($\chi^2 = 47.866$; $p = 0.000$ и $\chi^2 = 15.875$; $p = 0.000$ соответственно) (табл. 3). Ранее было показано, что на хромосомах с мутацией с.35delG

у индивидов с НСНТ из Туниса, Алжира, Марокко и Греции аллель 105 (D13S175) также обнаруживается с высокой частотой (от 67 до 100%) [9, 12, 46]. Аллель 111 (D13S175) не обнаружен на хромосомах индивидов с НСНТ, но встречается на 2% хромосом у лиц с нормальным слухом.

D13S143. Маркер D13S143 имеет восемь аллельных вариантов [9, 12], из них в этнических группах из Волго-Уральского региона выявлены семь. Аллель 130 (D13S143) является наиболее частым как на нормальных хромосомах (79%), так и на хромосомах с с.35delG (80%), а аллель 134 (D13S143) чаще обнаруживается на хромосомах индивидов с мутацией с.35delG ($\chi^2 = 9.909$; $p = 0.005$).

Таким образом, при анализе распределения частот аллелей трех микросателлитных локусов D13S141, D13S175 и D13S143 на нормальных хромосомах и хромосомах с мутацией с.35delG было установлено выраженное неравновесие по сцеплению между определенными аллелями данных маркеров и мутацией с.35delG в гене *GJB2* (табл. 3). Степень ассоциаций аллелей изученных внегенных микросателлитных локусов наглядно отражает стандартный коэффициент аллельной ассоциации (ΔSt) [39]: наибольшая степень сцепления с мутацией с.35delG характерна для аллеля 125 маркера D13S141 ($\Delta St = -0.438$) и аллеля 105 маркера D13S175 ($\Delta St = -0.386$).

Гаплотипический анализ и определение возраста мутации с.35delG

Учитывая данные, полученные нами при изучении полиморфизма маркеров D13S141, D13S175 и D13S143, неравновесное сцепление их опреде-

ленных аллелей с мутацией с.35delG в кодирующем регионе *GJB2*, мы предположили, что они могут свидетельствовать о существовании единого предкового гаплотипа, включающего эту мутацию. В связи с этим по трем полиморфным локусам реконструированы гаплотипы членов каждой из 56 семей с наследственной глухотой и здоровых доноров. Точная идентификация гаплотипа по аллелям D13S175–D13S143–D13S141 возможна для 112 мутантных хромосом с с.35delG и 358 нормальных хромосом.

Во всех анализируемых хромосомах выявлено 59 различных вариантов гаплотипов, из которых 52 обнаруживались на нормальных хромосомах и 25 – на хромосомах с мутацией с.35delG (табл. 4).

Распределение гаплотипов на 358 нормальных хромосомах характеризуется высоким значением гаплотипического разнообразия ($h = 0.943$), причем частота самого распространенного гаплотипа 123-105-130 составляет 17.8%, и 11 других гаплотипов обнаруживаются с частотами, превышающими 2%. Распределение частот гаплотипов на 112 хромосомах с мутацией с.35delG отличается более низким значением гаплотипического разнообразия ($h = 0.645$), наиболее частым является гаплотип 125-105-130 (59%), и частота шести гаплотипов превышает 2%. Семь гаплотипов, редко встречающихся на мутантных хромосомах (менее 2%), не были выявлены на нормальных хромосомах. Наглядное графическое представление частот встречаемости гаплотипов D13S141–D13S175–D13S143 на нормальных хромосомах здоровых доноров и хромосомах с мутацией с.35delG у индивидов с НСНТ приведено на рис. 4.

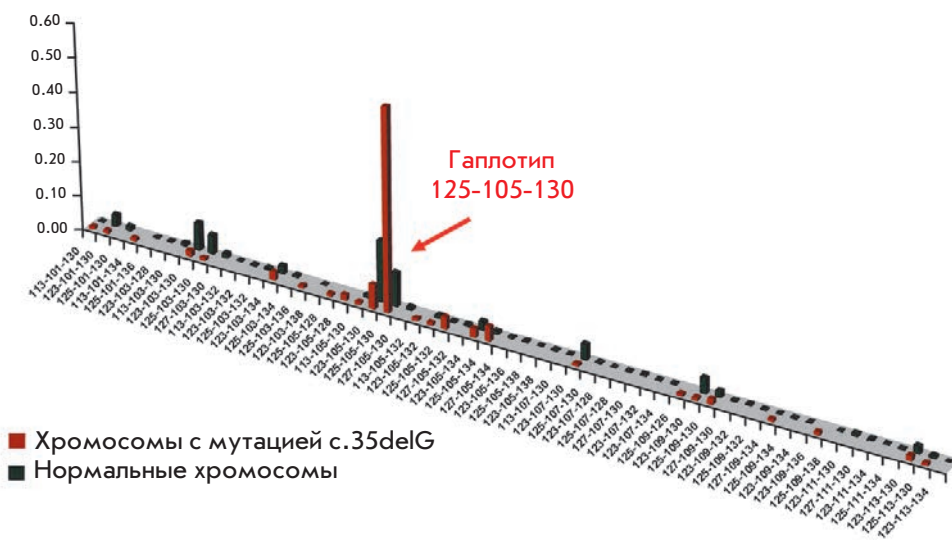


Рис. 4. Распределение частот гаплотипов D13S141–D13S175–D13S143 на нормальных хромосомах и хромосомах с мутацией с.35delG у больных с НСНТ. По оси ординат указаны частоты гаплотипов, по оси абсцисс – названия гаплотипов. Стрелкой показан гаплотип 125-105-130.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Таблица 4. Частоты гаплотипов D13S141–D13S175–D13S143, выявленные на хромосомах пациентов с генотипом с.35delG / с.35delG и на нормальных хромосомах у здоровых доноров из Волго-Уральского региона

Гаплотип	Индивиды с.35delG / с.35delG		Контроль в целом		Русские		Татары		Башкиры	
	Абсолютное значение	Частота	Абсолютное значение	Частота	Абсолютное значение	Частота	Абсолютное значение	Частота	Абсолютное значение	Частота
113-101-130	1	0.009	1	0.002	0	0	1	0.008	0	0
123-101-130	1	0.009	12	0.033	4	0.023	7	0.056	1	0.016
125-101-130	0	0	4	0.011	4	0.023	0	0	0	0
113-101-134	1	0.009	0	0	0	0	0	0	0	0
125-101-136	0	0	1	0.002	1	0.006	0	0	0	0
123-103-128	0	0	1	0.002	0	0	1	0.008	0	0
113-103-130	0	0	3	0.008	2	0.012	1	0.008	0	0
123-103-130	2	0.018	28	0.078	13	0.076	12	0.097	3	0.048
125-103-130	1	0.009	20	0.055	12	0.070	4	0.032	4	0.064
127-103-130	0	0	5	0.013	4	0.023	0	0	1	0.016
113-103-132	0	0	1	0.002	0	0	1	0.008	0	0
123-103-132	0	0	1	0.002	0	0	1	0.008	0	0
125-103-132	0	0	2	0.005	1	0.006	1	0.008	0	0
123-103-134	3	0.027	8	0.022	2	0.012	4	0.032	2	0.032
125-103-134	0	0	3	0.008	3	0.017	0	0	0	0
125-103-136	1	0.009	0	0	0	0	0	0	0	0
123-103-138	0	0	1	0.002	0	0	1	0.008	0	0
125-105-128	1	0.009	0	0	0	0	0	0	0	0
123-105-128	2	0.018	0	0	0	0	0	0	0	0
113-105-130	1	0.009	3	0.008	3	0.017	0	0	0	0
123-105-130	8	0.071	64	0.178	25	0.145	24	0.194	15	0.242
125-105-130	66	0.590	35	0.097	24	0.140	5	0.040	6	0.097
127-105-130	0	0	3	0.008	3	0.017	0	0	0	0
113-105-132	1	0.009	0	0	0	0	0	0	0	0
123-105-132	1	0.009	3	0.008	0	0	2	0.016	1	0.016
125-105-132	4	0.036	1	0.002	1	0.006	0	0	0	0
127-105-132	0	0	2	0.005	2	0.012	0	0	0	0
123-105-134	3	0.027	9	0.025	3	0.017	4	0.032	2	0.032
125-105-134	5	0.045	4	0.011	3	0.017	1	0.008	0	0
127-105-134	0	0	1	0.002	0	0	1	0.008	0	0
123-105-136	0	0	2	0.005	0	0	2	0.016	0	0
125-105-138	0	0	1	0.002	0	0	1	0.008	0	0
123-105-138	0	0	1	0.002	1	0.006	0	0	0	0
113-107-130	0	0	1	0.002	0	0	1	0.008	0	0
123-107-130	1	0.009	16	0.044	4	0.023	4	0.032	8	0.129
125-107-130	0	0	1	0.002	1	0.006	0	0	0	0
123-107-128	0	0	1	0.002	0	0	0	0	1	0.016
125-107-128	0	0	1	0.002	0	0	1	0.008	0	0
127-107-130	0	0	2	0.005	0	0	2	0.016	0	0
123-107-132	0	0	1	0.002	0	0	1	0.008	0	0
123-107-134	0	0	1	0.002	0	0	1	0.008	0	0
125-109-126	1	0.009	0	0	0	0	0	0	0	0
123-109-130	1	0.009	16	0.044	9	0.052	4	0.032	3	0.048
125-109-130	2	0.018	7	0.019	6	0.035	1	0.008	0	0
127-109-130	0	0	1	0.002	1	0.006	0	0	0	0
123-109-132	0	0	2	0.005	1	0.006	1	0.008	0	0
125-109-132	0	0	1	0.002	1	0.006	0	0	0	0
127-109-134	1	0.009	1	0.002	0	0	0	0	1	0.016
125-109-134	0	0	1	0.002	1	0.006	0	0	0	0
123-109-134	0	0	1	0.002	1	0.006	0	0	0	0
123-109-136	1	0.009	0	0	0	0	0	0	0	0
125-109-138	0	0	1	0.002	1	0.006	0	0	0	0
123-111-130	0	0	3	0.008	0	0	3	0.024	0	0
127-111-130	0	0	2	0.005	1	0.006	0	0	1	0.016
123-111-134	0	0	1	0.002	0	0	1	0.008	0	0
125-111-134	0	0	1	0.002	0	0	0	0	1	0.016
123-113-130	2	0.018	8	0.022	6	0.035	1	0.008	1	0.016
125-113-130	1	0.009	3	0.008	2	0.012	1	0.008	0	0
123-113-134	0	0	1	0.002	0	0	0	0	1	0.016
Гаплотипическое разнообразие	0.645		0.943		0.944		0.917		0.946	
Всего хромосом	112		358		172		124		62	
Количество вариантов гаплотипов	25		52		32		32		17	

Анализ распределения гаплотипов D13S141–D13S175–D13S143 на нормальных хромосомах лиц различного этнического происхождения (русские, татары, башкиры) выявил различия в спектре гаплотипов в изученных этнических группах и статистически значимые различия в частотах гаплотипов ($\chi^2 = 57.335$, $p = 0.000$ d.f. = 56). У русских (число проанализированных хромосом – 172) выявлено 32 гаплотипа из 59, обнаруженных в общей выборке, у татар (число хромосом 124) – 32 из 59, у башкир (62 хромосомы) – 17 из 59 гаплотипов.

Наиболее распространенными гаплотипами у русских были 123-105-130 (14.5%), 125-105-130 (14.0%) и 123-103-130 (7.6%), остальные 29 гаплотипов встречались с различными частотами – от 0.6% (12 гаплотипов) до 7.0% (гаплотип 125-103-130). На нормальных хромосомах у татар самыми частыми были 123-105-130 и 123-103-130 с частотами 19.4 и 9.7% соответственно, а частоты остальных 30 гаплотипов варьировали от 0.8% (19 гаплотипов) до 5.6% (гаплотип 123-101-130). У башкир с наибольшей частотой регистрировались гаплотипы 123-105-130 (24.2%), 123-107-130 (12.9%) и 125-105-130 (9.7%), суммарная частота которых достигает 46.8%. Частоты оставшихся 14 гаплотипов варьировали от 1.6% (9 гаплотипов) до 6.4% (гаплотип 125-103-130). Кроме того, в каждой этнической группе с невысокими частотами обнаружены специфические, не встречающиеся в других группах, гаплотипы D13S141–D13S175–D13S143: у русских – 14 гаплотипов, у татар – 15, у башкир – 4.

Таким образом, анализ гаплотипов D13S141–D13S175–D13S143 выявил достоверно более высокую частоту гаплотипа 125-105-130 на хромосомах с мутацией с.35delG по сравнению с хромосомами здоровых доноров ($\chi^2 = 64.866$, $p < 0.001$), а также этноспецифичность спектров и частот встречаемости гаплотипов D13S141–D13S175–D13S143 в трех этнических группах здоровых доноров.

В табл. 5 приведены данные об ассоциации и неравновесии по сцеплению аллелей маркеров D13S175, D13S143 и D13S141 с мутацией с.35delG.

Таблица 5. Ассоциация и неравновесие по сцеплению аллелей маркеров D13S141, D13S175, D13S143 с мутацией с.35delG

Маркер	Аллель	p (95% уровень значимости)	χ^2	δ
D13S141	125	< 0.001	67.05872	0.636179
D13S175	105	< 0.001	47.8665	0.666045
D13S143	130	0.81	0.08801	0.062381

Наибольшие значения параметра неравновесия по сцеплению получены для аллелей 105 и 125 маркеров D13S175 и D13S141 соответственно, расположенных проксимально по отношению к гену *GJB2*, наименьшее – для аллелей дистально расположенного маркера D13S143. Исходя из значений χ^2 и параметра неравновесия по сцеплению δ , наиболее вероятный гаплотип основателя (предковый гаплотип) представляется состоящим из аллелей 125-105-130 (рис. 4). Гаплотип 125-105-130 выявлен на 59% всех хромосом, несущих мутацию с.35delG, что достоверно выше ($p < 0.001$) частоты этого гаплотипа (9.7%) на нормальных хромосомах.

Для расчета числа поколений, прошедших после начала распространения мутации с.35delG в популяциях Волго-Уральского региона, выбраны два маркера – D13S175 и D13S141. Критерием отбора данных маркеров служили относительно высокие показатели значения параметров χ^2 и меры неравновесия по сцеплению δ , также учитывали статистически значимые отличия в распределении частот аллелей этих маркеров между хромосомами с мутацией с.35delG и без нее.

Не выявлено статистически значимых отличий в распределении частот аллелей маркера D13S143 между хромосомами с с.35delG и без данной мутации (табл. 3), при этом наблюдалось также минимальное значение параметра неравновесия по сцеплению (табл. 5). Преобладание аллеля 130 данного STR-маркера в двух группах хромосом (с мутацией с.35delG и без нее) формально объясняет отсутствие статистически значимых отличий. Тем не менее, учитывая статистически значимые отличия, полученные для двух других, более близких к мутации с.35delG, STR-маркеров, существование предкового для мутации с.35delG гаплотипа, включающего область, покрываемую маркерами D13S141–D13S175–D13S143, и его последующее «размывание» за счет рекомбинационных и мутационных событий на протяжении большого числа поколений, представляется вполне вероятным. Однако отсутствие статистически значимой ассоциации наиболее частого аллеля 130 (D13S143) с предковым гаплотипом послужило основанием для исключения D13S143 из числа маркеров, по которым рассчитывали число поколений (табл. 6).

После начала дивергенции предкового гаплотипа с мутацией с.35delG в популяциях Волго-Уральского региона, прошло от 133 до 470 поколений (в среднем, 301 поколение). При оценке возраста (в годах) предкового гаплотипа, реконструированного на территории Волго-Уральского региона, продолжительность жизни одного поколения, как и в других работах, считали равной 25 годам (табл. 6).

Таблица 6. Число поколений, прошедших с момента распространения мутации с.35delG в Волго-Уральском регионе

Маркер	Число поколений с момента появления мутации в популяции, q	Число лет с начала экспансии	Начало экспансии, год до н.э.
D13S175 (аллель 105)	470	11800	9800
D13S141 (аллель 125)	133	3300	1300
Среднее значение	301	7500	5500

Таким образом, время, за которое произошла экспансия хромосом, несущих мутацию с.35delG, в популяциях Волго-Уральского региона находится в интервале от 3300 до 11800 лет (среднее значение ~ 7500). Однако подобная оценка числа поколений (на основании физического расстояния) часто приводит к завышенному «возрасту» мутации, поскольку учитывается не наблюдаемое, а вероятное значение мутационных событий. Поэтому при таком подходе предпочитают ориентироваться не на средние значения, а выбирают наиболее удаленный, но еще сцепленный с локусом заболевания маркер, так называемую границу стабильного гаплотипа [47]. В рассмотренном случае это маркер D13S175. Если предположить, что число поколений, рассчитанное по данному маркеру, более точное, то наиболее вероятное время экспансии гаплотипа-основателя с мутацией с.35delG в популяциях Волго-Уральского региона составляет ~ 11800 лет. Такая датировка начала экспансии с.35delG в Волго-Уральском регионе соответствует результатам, полученным в исследованиях, выполненных с использованием различных ДНК-маркеров (SNP- и STR-маркеры) в других популяциях Евразийского континента (10000–14000 лет назад) [9–12].

Результаты гаплотипического анализа, оценка «возраста» мутации с.35delG и данные о понижающем градиенте ее частоты в направлении юг–север в популяциях Европы позволили рассматривать территории Ближнего Востока или Средиземноморья (возможно, современной Греции) как наиболее вероятные центры происхождения с.35delG, откуда вместе с неолитическими миграциями человека она широко распространилась по территории Европы [9–12]. Анализ гаплотипического разнообразия (с исполь-

зованием STR-маркеров) и приблизительная оценка «возраста» мутации с.35delG в Волго-Уральском регионе в целом свидетельствуют в пользу «традиционной» неолитической гипотезы о происхождении и распространенности этой мутации.

Таким образом, учитывая единый временной континуум начала распространения мутации с.35delG в Евразии, полученный при использовании различных систем ДНК-маркеров (SNP- и STR-маркеров), для однозначного ответа о центре происхождения мутации с.35delG необходима оценка мирового гаплотипического разнообразия хромосом с этой мутацией по единой системе ДНК-маркеров.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ частоты гетерозиготного носительства мутации с.35delG гена *GJB2* в популяциях Евразии выявил тенденцию к градиентному понижению частоты с.35delG с запада на восток континента, начиная с популяций Восточной Европы и Волго-Уральского региона, со средними частотами 3.3 и 1.4% соответственно, низкой частотой (0.8–0.9%) в популяциях Центральной Азии, минимальной частотой (0.4%) у якутов в Восточной Сибири и отсутствием с.35delG у алтайцев (Южная Сибирь).

Гаплотипический анализ хромосом с мутацией с.35delG позволил реконструировать предковый гаплотип с этой мутацией и подтвердить единство происхождения большинства изученных мутантных хромосом больных с НСНТ, проживающих на территории Волго-Уральского региона. Датировка времени экспансии носителей мутации с.35delG, полученная нами (11800 лет), в целом соответствует мировым значениям «возраста» этой мутации (10000–14000 лет).

Совокупность полученных данных позволит, возможно, уточнить или пересмотреть существующие представления о центре и времени происхождения мутации с.35delG (*GJB2*) и о факторах, определяющих ее мировую распространенность. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (№ 09-04-01123-а), Федеральных целевых программ «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. (№ 16.740.11.0190, 16.740.11.0346) и 2010–2012 гг. (№ 02.740.11.0701), а также при поддержке Министерства образования и науки РФ (госконтракты П325 и П601) и Госконтракта № 16.512.11.2047.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Marazita M.L., Ploughman L.M., Rawlings B., Remington E., Arnos K.S., Nance W.E. // *Am. J. Med. Genet.* 1993. V. 46. № 5. P. 486–491.
2. van Camp G., Smith R. // 2009. <http://webhost.ua.ac.be/hhh/>
3. Maeda S., Nakagawa S., Suga M., Yamashita E., Oshima A., Fujiyoshi Y., Tsukihara T. // *Nature.* 2009. V. 458. № 7238. P. 597–602.
4. Kikuchi T., Kimura R.S., Paul D.L., Adams J.C. // *Anat. Embryol. (Berl.)*. 1995. V. 191. № 2. P. 101–118.
5. Morell R.J., Friderici K.H., Wei S., Elfenbein J.L., Friedman T.B., Fisher R.A. // *N. Engl. J. Med.* 1998. V. 339. P. 1500–1505.
6. van Laer L., Huizing E.H., Verstreken M., van Zuijlen D., Wauters J.G., Bossuyt P.J., van de Heyning P., McGuirt W.T., Smith R.J. // *J. Med. Genet.* 2001. V. 38. P. 515–518.
7. Yan D., Ke X., Blanton S.H., Ouyang X.M., Pandya A., Du L.L., Nance W.E., Liu X.Z. // *Hum. Genet.* 2003. V. 114. P. 44–50.
8. RamShankar M., Girirajan S., Dagan O., Ravi Shankar H.M., Jalvi R., Rangasayee R., Avraham K.B., Anand A. // *J. Med. Genet.* 2003. V. 40. P. 68.
9. Abidi O., Boulouiz R., Nahili H., Ridal M., Noureddine A.M., Tlili A., Rouba H., Masmoudi S., Chafik A., Hassar M., et al. // *Genet. Test. Mol. Biomark.* 2007. V. 12. № 4. P. 569–574.
10. Kokotas H., Grigoriadou M., Villamar M., Giannoulia-Karantana A., del Castillo I., Petersen B.M. // *Genet. Test. Mol. Biomark.* 2010. V. 14. №2. P. 183–187.
11. Najmabadi H., Cucci R., Sahebjam S., Kouchakian N., Farhadi M., Kahrizi K., Arzhanghi S., Daneshmandan N., Javan K., Smith R.J.H. // *Hum. Mutat.* 2002. V. 504. P. 135–138.
12. Kokotas H., van Laer L., Grigoriadou M., Ferekidou E., Papadopoulou E., Neou P., Giannoulia-Karantana A., Kandiloros D., Korres S., Petersen M.B. // *Am. J. Med. Genet.* 2008. V. 146A. P. 2879–2884.
13. Brobby G., Müller-Myhsok B., Horstmann R. // *N. Engl. J. Med.* 1998. V. 338. № 8. P. 548–550.
14. Hamelmann C., Amedofu G.K., Albrecht K., Muntau B., Gelhaus A., Brobby G.W., Horstmann R.D. // *Hum. Mutat.* 2001. V. 18. № 1. P. 84–85.
15. Anichkina A., Kulenich T., Zinchenko S., Shagina I., Polyakov A., Ginter E., Evgrafov O., Viktorova T., Khusnutdinova E. // *Eur. J. Hum. Genet.* 2001. V. 9. P. 151.
16. Некрасова Н.Ю., Шагина И.А., Петрин А.Н., Поляков А.В. // *Мед. генет.* 2002. Т. 1. № 6. С. 290–294.
17. Зинченко Р.А., Ельчинова Г.И., Барышников Н.В., Поляков А.В., Гинтер Е.К. // *Генетика.* 2007. Т. 43. № 9. С. 1246–1254.
18. Зинченко Р.А., Зинченко С.П., Галкина В.А. // *Генетика.* 2003. Т. 39. № 9. С. 1275–1284.
19. Осетрова А.А., Шаронова Е.И., Россинская Т.Г., Зинченко Р.А. // *Мед. генет.* 2010. № 9. С. 30–40.
20. Хидиятова И.М., Джемилева Л.У., Хабибуллин Р.М., Хуснутдинова Э.К. // *Молекуляр. биология.* 2002. Т. 36. № 3. С. 438–441.
21. Хуснутдинова Э.К., Джемилева Л.У. // *Вест. биотех. физико-хим. биол.* 2005. № 1. С. 24–31.
22. Джемилева Л.У., Барашков Н.А., Посух О.Л., Хусаинова Р.И., Ахметова В.Л., Кутуев И.А., Тадинова В.Н., Федорова С.А., Хидиятова И.М., Хуснутдинова Э.К. // *Мед. генет.* 2009. № 8. С. 20–28.
23. Джемилева Л.У., Посух О.Л., Тазетдинов А.М., Барашков Н.А., Журавский С.Г., Пониделко С.Н., Маркова Т.Г., Тадинова В.Н., Федорова С.А., Максимова Н.Р. и др. // *Генетика.* 2009. № 7. С. 982–991.
24. Dzhemileva L.U., Barashkov N.A., Posukh O.L., Khusainova R.I., Akhmetova V.L., Kutuev I.A., Gilyazova I.R., Tadinova V.N., Fedorova S.A., Khidiyatova I.M., et al. // *J. Hum. Genet.* 2010. V. 55. № 11. P. 749–754.
25. Posukh O.L., Pallares-Ruiz N., Tadinova V., Osipova L., Claustres M., Roux A.F. // *BMC Med. Genet.* 2005. V. 6. № 12. P. 1–7.
26. Барашков Н.А., Джемилева Л.У., Федорова С.А., Максимова Н.Р., Хуснутдинова Э.К. // *Вест. оторинолар.* 2008. № 5. С. 23–28.
27. Барашков Н.А., Джемилева Л.У., Федорова С.А., Терютин Ф.М., Федорова Э.Е., Гуринова Е.Е., Алексеева С.П., Кононова С.К., Ноговицына А.Н., Хуснутдинова Э.К. // *Мед. генет.* 2010. Т. 9. № 7. С. 22–33.
28. Шокарев Р.А., Амелина С.С., Кривенцова Н.В. // *Мед. генет.* 2005. Т. 4. № 12. С. 556–567.
29. Шокарев Р.А., Амелина С.С., Зинченко Р.А., Ельчинова Г.И., Хлебникова О.О., Близнец Е.А., Тверская С.М., Поляков А.В., Зинченко Р.А. // *Мед. генет.* 2006. Т. 5. С. 38–43.
30. Божкова В.П., Хашаев З.Х., Уманская Т.А. // *Биофизика.* 2010. Т. 55. № 3. С. 514–525.
31. Таварткиладзе Г.А., Поляков А.В., Маркова Т.Г., Лалаянц М.Р., Близнец Е.А. // *Вест. оторинолар.* 2010. № 3. С. 1–18.
32. Тазетдинов А.М., Джемилева Л.У., Хуснутдинова Э.К. // *Генетика.* 2008. Т. 44. № 6. С. 725–733.
33. Denoyelle F., Weil D., Maw M. // *Hum. Mol. Genet.* 1997. V. 12. № 6. P. 2173–2177.
34. Petrukhin K.E., Speer M.C., Cayanis E., Bonaldo M.F., Tantravahi U., Soares M.B., Fischer S.G., Warburton D., Gilliam T.C., Ott J. // *Genomics.* 1993. V. 15. № 1. P. 76–85.
35. Brown K.A., Janura A., Karbani G., Parrys G., Noble A., Crockford G., Bishop D.T., Newton V.E., Markham A.F., Mueller R.F. // *Hum. Mol. Genet.* 1996. V. 5. P. 169–173.
36. Rothrock C.R., Murgia A., Sartorato E.L., Leonardi E., Wei S., Lebeis S.L., Yu L.E., Elfenbein J.L., Fisher R.A., Friderici K.H. // *Hum. Genet.* 2003. V. 113. P. 18–23.
37. Bengtsson B.O., Thompson G. // *Tissue Antigens.* 1981. V. 18. P. 356–363.
38. Risch N., de Leon D., Ozelius L. // *Nat. Genet.* 1995. V. 9. № 2. P. 152–159.
39. Krawczak M., Konecki D.S., Schmidtke I. // *Hum. Genet.* 1988. V. 80. P. 78–80.
40. Nei M. *Molecular Evolutionary Genetics.* New York: Columbia University Press, 1987. 275 p.
41. Petersen M., Willems P. // *Clin. Genet.* 2006. V. 69. P. 371–392.
42. Gasparini P., Rabionet R., Barbujani G., Melchionda S., Petersen M., Brondum-Nielsen K., Metspalu A., Oitmaa E., Pisano M., Fortina P., et al. // *Eur. J. Hum. Genet.* 2000. V. 8. № 1. P. 19–23.
43. Lucotte G. // *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 2007. V. 71. P. 741–746.
44. Mahdieh N., Rabbani B. // *Int. J. Audiol.* 2009. V. 48. P. 363–370.
45. Shahin H., Walsh T., Sobe T., Lynch E., King M.-C., Avraham K.B., Kanaan M. // *Hum. Genet.* 2002. V. 110. P. 284–289.
46. Belguith H., Hajji S., Salem N., Charfeddine I., Lahmar I., Amor M.B., Ouldim K., Chouery E., Driss N., Drira M., et al. // *Clin. Genet.* 2005. V. 68. P. 188–189.
47. Slatkin M., Rannala B. // *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2000. V. 1. P. 225–249.

УДК 571.27:578.22

Эффективная экспрессия наноантител рекомбинантным аденовирусным вектором *in vitro*

И. Ю. Грибова¹, С. В. Тиллиб², И. Л. Тутыхина¹, М. М. Шмаров¹, Д. Ю. Логунов¹,
Л. В. Верховская¹, Б. С. Народицкий^{1*}, А. Л. Гинцбург¹

¹ФГБУ Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии
им. Н.Ф. Гамалеи Минздравсоцразвития РФ, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

²Учреждение Российской академии наук Институт биологии гена РАН, 119334, Москва,
ул. Вавилова, 34/5

*E-mail: bsnar1941@yahoo.com

Поступила в редакцию 12.05.2011 г.

РЕФЕРАТ Представленная работа посвящена возможности экспрессии однодоменного мини-антитела (наноантитела), отобранного из библиотеки последовательностей переменных доменов особых одноцепочечных антител иммунизированного верблюда, ген которого введен в эукариотические клетки в составе рекомбинантного аденовирусного вектора. Вектор, несущий ген однодоменного наноантитела, получен с использованием системы AdEasy Adenoviral Vector System («Stratagene»). Показано, что такой способ доставки гена наноантитела обеспечивает его эффективную экспрессию и функциональную активность наноантитела. Полученные результаты могут использоваться при создании средств пассивной иммунизации для защиты от патогенов или иммунобиологических противотоксических препаратов нового поколения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА рекомбинантный аденовирусный вектор, наноантитела, генетическая иммунизация.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ НЕК-293 – клетки эмбриональной почки человека; His₆-tag – последовательность из шести остатков гистидина; HA-tag – эпитоп гемагглютинина вируса гриппа, пептид YPYDVPDYA; БОЕ – бляшкообразующие единицы; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ПВДФ – поливинилиденфторид; ОТ-ПЦР – обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией; GAPDH – глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа.

ВВЕДЕНИЕ

Антитела – важнейший инструмент иммунной системы, участвующий в защите организма от патогенных микроорганизмов. Все большее значение антитела приобретают в связи с возможностью их использования не только в диагностических, но и в терапевтических целях [1]. Антитела успешно применяют при некоторых формах онкологических заболеваний. В последние десятилетия в диагностических и исследовательских целях широко используются моноклональные антитела. Однако классические методы получения моноклональных антител, основанные на работе с клетками животного происхождения, затрудняют их использование в качестве терапевтических средств. Введение таких моноклональных тел в организм человека может привести к развитию нежелательной иммунной реакции, особенно при повторном применении [2]. С целью предотвращения возникновения подобных реакций разработаны следующие подхо-

ды: получение рекомбинантных иммуноглобулинов, в которых участки, не отвечающие за распознавание антигена, заменены соответствующими фрагментами человеческого происхождения (гуманизированные антитела); удаление доменов, не вовлеченных в связывание антигена (мини-антитела). В последнее время все чаще применяются так называемые рекомбинантные технологии, основанные на работе с библиотеками последовательностей антител человека. При построении таких библиотек в экспрессионном векторе случайным перебором в одной рамке считывания с помощью линкерной последовательности соединяют переменные домены тяжелой и легкой цепи [3]. Работа с громоздкими библиотеками таких одноцепочечных антител (scFv) весьма трудоемка, а в результате редко удается получить высокоаффинное антитело. Определенные сложности связаны с нестабильностью генетических конструкций, низким уровнем экспрессии продукта и его растворимостью [4].

Существенный прорыв в этой области связан с обнаружением у представителей сем. Верблюдовых (Camelidae) неканонических антител, лишенных легких цепей и представляющих собой димер укороченных тяжелых цепей [5, 6]. Иммунный ответ с участием этих антител можно вызвать классической иммунизацией. Использование репертуара этих неканонических антител для создания библиотек последовательностей переменных доменов (только тяжелой цепи) имеет целый ряд преимуществ. Однодоменная структура узнающего переменного домена обуславливает малый размер антигенсвязывающего фрагмента (мини-антитела), его высокую стабильность и растворимость [7].

Благодаря особенностям строения мини-антитела могут использоваться для выявления эпитопов, скрытых для классических иммуноглобулинов. Экспрессия с одного гена упрощает генно-инженерные манипуляции и, как следствие, работу с библиотеками последовательностей переменных доменов. Низкая иммуногенность (обусловленная высокой гомологией последовательностей мини-антител с переменным доменом тяжелых цепей IgG3 человека) и простота гуманизации открывают широкие возможности использования мини-антител для создания лекарственных средств нового типа [8].

Описанные особенности структуры мини-антител и простота манипуляций с их генами позволяют эффективно и экономично нарабатывать мини-антитело в больших количествах, используя различные системы экспрессии [9].

Применение прокариотических систем экспрессии для продукции белков млекопитающих связано с возможной низкой функциональной активностью получаемых белков из-за отсутствия в клетках прокариот системы посттрансляционных модификаций. Кроме того, как бы тщательно ни проводилась очистка, конечный продукт может быть загрязнен пирогенами.

Один из перспективных способов доставки генетического материала в клетки-мишени – использование вирусных векторов. С помощью методов генной инженерии в геном вирусов встраивают экспрессионные конструкции, несущие один или несколько рекомбинантных генов. Для доставки генов мини-антител в целевые клетки в ряде работ предлагаются векторы на основе генома аденоассоциированного вируса [10, 11].

К наиболее универсальным инструментам доставки и экспрессии рекомбинантных генов в клетках млекопитающих относятся аденовирусные векторы. Известно, что рекомбинантные аденовирусы эффективно переносят гены бактериальных и вирусных антигенов, цитокинов, факторов роста и других белков

в клетки-мишени, обеспечивая в них высокий уровень и длительность экспрессии целевого гена [12]. Аденовирусные векторы способны трансдуцировать как делящиеся, так и постмитотические клетки; ДНК аденовируса остается во внехромосомной форме, а сам рекомбинантный вирус выводится из организма в течение 4–5 нед [13, 14].

Получение рекомбинантных аденовирусов характеризуется следующей особенностью: вирус способен размножаться только в специальных линиях клеток *in vitro*, что обеспечивает безопасность вектора [15].

Эффективное использование рекомбинантных аденовирусных векторов для экспрессии антигенсвязывающих фрагментов антител показано на примере мини-антител к клеточному эпитопу (рецептору фактора роста эпидермиса (erbB-2)) и к компоненту сибиреязвенного токсина [16, 17].

Цель данной работы – изучение возможности использования рекомбинантных аденовирусных векторов для доставки и эффективной экспрессии однодоменных мини-антител (наноантител), полученных с использованием новой перспективной технологии генерирования особых верблюжьих одноцепочечных антител. В качестве модельного антитела, на котором показана принципиальная возможность экспрессии рекомбинантными аденовирусами однодоменных антител, полученных иммунизацией представителей Верблюдовых, выбрано полученное ранее и охарактеризованное наноантитело к клеточному цитокератину-8 [18].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Ферменты

В работе использовали эндонуклеазы рестрикции, ДНК-лигазу фага T4, щелочную фосфатазу (CIAP) фирмы «Fermentas MBI» (Литва), Taq-полимеразу фирмы «Promega» (США).

Клеточные линии

Использовали линию клеток HEK-293 (клетки эмбриональной почки человека, трансформированные E1-областью аденовируса человека серотипа 5) и линию H1299 (клетки рака легкого человека). Клетки культивировали в среде DMEM, содержащей 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (ФСК) производства «HyClone» (США).

Получение клона кДНК, кодирующего однодоменное мини-антитело (наноантитело), специфически узнающее эндогенный цитокератин-8 мыши

Наноантитело аСyK-V_HN, специфически узнающее цитокератин-8 мыши, получено ранее в группе Тил-

либа С.В. (ИБГ РАН, Москва) в ходе совместной работы с лабораторией Муйлдерманса (S. Muyldermans, Vrije Universiteit Brussel) и использовано (путем соединения с последовательностью флуоресцентного белка) для получения флуоресцентных наноантител («fluorescent nanobody», или «chromobodies») с целью демонстрации нового метода слежения за антигеном в живой клетке. Следует отметить, что наноантитело аСук- $V_{H}N$ было одним из первых наноантител к эндогенным структурным белкам эукариот. Первый этап его получения включал иммунизацию двугорбого верблюда (*Camelus bactrianus*) экстрактом белков из клеток мягких тканей мыши (в основном из печени). Последующую процедуру селекции, основанную на методе фагового дисплея, проводили, как описано в онлайн-приложении к статье [18]. Принципиальным этапом после отбора наиболее обогащающихся клонов наноантител была идентификация узнаваемого этими наноантителами неизвестного антигена. Белки из зоны связывания наноантитела при Вестерн-блот-анализе дополнительно разделяли с помощью электрофореза до индивидуальных продуктов, затем с помощью Вестерн-блоттинга анализировали узнавание каждого продукта наноантителом. Узнаваемый наноантителом продукт идентифицировали с помощью масс-спектрометрического анализа его трипсинового гидролизата. Полученное в результате наноантитело аСук- $V_{H}N$ узнавало цитокератин-8, что подтверждено и иммунофлуоресцентным окрашиванием этими антителами линии миобластов (C2C12) мыши, выявившее характерное распределение в цитоплазме промежуточных цитокератиновых филаментов.

Получаемое в периплазме бактерий наноантитело аСук- $V_{H}N$ с целью его очистки и облегчения детекции было адаптировано путем присоединения к С-концу антигенузнающей последовательности еще двух небольших фрагментов: эпитопа гемагглютинаина вируса гриппа (HA-tag) и шести остатков гистидина (His₆-tag).

Получение рекомбинантного аденовируса

Плазмиды и рекомбинантный аденовирусный вектор получали с использованием гена наноантитела к цитокератину аСук- $V_{H}N$. Нуклеотидная последовательность, кодирующая наноантитело, получена химическим синтезом в ЗАО «Евроген». Для конструирования плазмидного вектора рAd-аСук- $V_{H}N$, содержащего геном рекомбинантного аденовируса с делецией области E1 и встроенной вместо нее кассетой экспрессии трансгена, методом гомологичной рекомбинации в клетках *E. coli* использовали систему AdEasy Adenoviral Vector System («Stratagene», США). Рекомбинантный аденовирус получали,

трансфицируя клетки линии HEK-293 линейаризованной по PacI-сайту плазмидной конструкцией рAd-аСук- $V_{H}N$. Для трансфекции использовали Lipofectamine 2000 («Invitrogen», США) согласно инструкции производителя. Контролем служил рекомбинантный аденовирус человека серотипа 5 с делецией области E1 и встроенной вместо нее кассетой экспрессии без трансгена – Ad-null.

Для накопления препаратов аденовируса на монослой клеток HEK-293 с конфлюэнтностью 50–70% наносили суспензию зараженных клеток (10^7 БОЕ вируса на чашку Петри диаметром 15 см). Суспензию инфицированных клеток разрушали с помощью трех циклов замораживания-оттаивания и осветляли центрифугированием (2000 об/мин, 10 мин, +4°C).

Титры препаратов Ad5-аСук- $V_{H}N$ и Ad-null, равные 10^8 БОЕ/мл, определяли методом бляшкообразования на культуре клеток HEK-293.

Заражение клеток рекомбинантным аденовирусом

Рекомбинантными аденовирусами инфицировали $\sim 10^6$ клеток линии H1299. Клетки рассеивали примерно до 70% монослоя, растили в течение 24 ч и заражали рекомбинантным аденовирусом (множественность инфекции 100 БОЕ на клетку) в среде DMEM, содержащей 2% ФСК. Через 2 ч после внесения вирусного препарата отбирали среду, промывали клеточную культуру и добавляли свежую среду DMEM. Среду от зараженных клеток отбирали через 72 ч после инфекции и концентрировали центрифужной ультрафильтрацией через мембрану с номинально отсекаемой молекулярной массой 10 кДа. Сконцентрированный в 10 раз супернатант фракционировали в 10% полиакриламидном геле и использовали для анализа методом иммуноблоттинга.

Подготовка антигена

Лизат гомогенизированной печени мыши линии BALB/c получали экстракцией буфером RIPA (50 мМ Трис-НСl pH 8.0, 150 мМ NaCl, 1% NP-40, 0.5% натрия дезоксихолат, набор ингибиторов протеаз («Roche», Швейцария)). Концентрацию суммарного белка в пробах измеряли по методу Бредфорд («Sigma-Aldrich», США). Пробы с одинаковой концентрацией белка наносили на гель для разделения с помощью электрофореза.

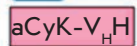
Электрофорез в полиакриламидном геле и иммуноблоттинг

Клеточные белки разделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях в присутствии додецилсульфата натрия по Лэммли. В качестве стандарта молекулярных масс использовали Protein Test Mixture 4 («Serva», Гер-

А



лидерная последовательность, обеспечивающая секрецию целевого белка

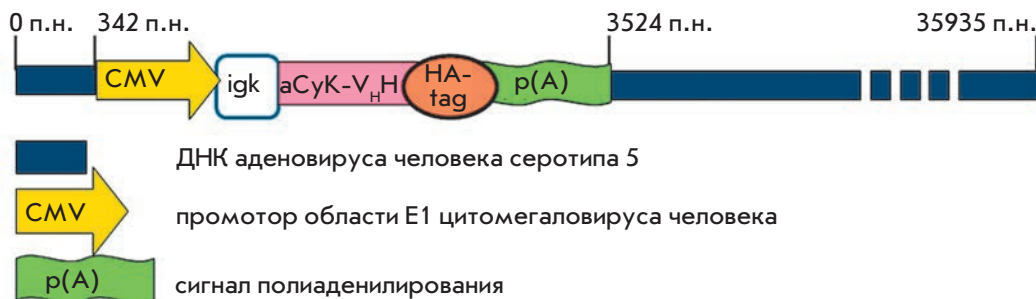


ген нанoантитела к цитокератину-8



эпитоп гемагглютинаина вируса гриппа

Б



мания). После гель-электрофореза белки переносили на ПВДФ-мембрану Hybond-P («GE Healthcare», США) с помощью TE70 Semi-Dry Transfer Unit («Hoefer Scientific», США) в соответствии с рекомендациями производителя оборудования. Нанoантитела детектировали с использованием конъюгата антител к HA-эпитопу вируса гриппа с пероксидазой хрена Monoclonal Anti-HA–Peroxidase antibody («Sigma-Aldrich», США). Иммунообезвреженные белки выявляли с использованием ECL Plus Western Blotting Detection Reagents («GE Healthcare», США) в соответствии с рекомендациями производителя. Хемилюминесцентное излучение регистрировали с помощью рентгеновской пленки Amersham Hyperfilm ECL («GE Healthcare», США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате ранее проведенной селекции фаговой библиотеки антигенсвязывающих доменов одноцепочечных антител отобрали ДНК фагмиды pHEN4 со вставкой, кодирующей нанoантитело, которое обладает высокой аффинностью к структурному цитоплазматическому белку мыши – цитокератину-8. Данные о структуре белка-мишени получены на основании масс-спектрометрической идентификации. Нуклеотидную последовательность, кодирующую нанoантитело, клонировали в рекомбинантном аденовирусном векторе.

Чтобы обеспечить эффективную внеклеточную экспрессию нанoантитела к его N-концу присоединяли лидерный пептид κ -цепи иммуноглобулина мыши. К C-концу нанoантитела присоединяли HA-tag, который эффективно узнается коммерческими антителами, что необходимо для подтверждения экспрессии нанoантитела на уровне белка. На рис. 1 представлена схема полученной конструкции.

Для конструирования аденовирусного вектора последовательность, кодирующую нанoантитело aCyK-VH, меченное HA-tag, клонировали в челночном плазмидном векторе pShuttle-CMV («Stratagene», США). Этот вектор содержит концевые фрагменты генома аденовируса человека серотипа 5, кассету экспрессии, содержащую промотор цитомегаловируса человека (CMV) и сигнал полиаденилирования. Наличие вставки и ее ориентацию подтверждали рестрикционным картированием.

Рекомбинантный плазмидный аденовирусный вектор, несущий целевой ген, получали методом гомологичной рекомбинации в клетках *E. coli*. Полученная плазмидная конструкция содержит сайт инициации репликации ori, ген устойчивости к антибиотику и кассету с целевым геном в составе генома аденовируса. Преимущество этого метода состоит в возможности использования клеток *E. coli* в качестве основного инструмента для клонирования, рекомбинации и получения аденовирусной ДНК в препаративных

Рис. 1. Схематическое изображение использованных генетических конструкций. А – Конструкция, содержащая ген нанoантитела к цитокератину-8. Б – Геном рекомбинантного аденовируса, несущий ген нанoантитела к цитокератину-8.

количествах. Возможность проведения гомологичной рекомбинации в клетках *E. coli* позволяет работать с индивидуальными клонами, содержащими плазмидные конструкции только с рекомбинантными аденовирусами, что исключает вероятность контаминации аденовирусом дикого типа.

Челночную плазмидную конструкцию, несущую кассету экспрессии с геном нанoантитела, линейаризовали по PmeI-сайту и вместе с pAd-EASY («Stratagene»), вводили в клетки *E. coli* BJ5183 методом электропорации. Рекомбинантные клоны, полученные в результате гомологичной рекомбинации, отбирали на селективной среде с канамицином (50 мкг/мл). Присутствие в плазмидной ДНК рекомбинантных клонов нуклеотидных последовательностей, кодирующих нанoантитело аСyК-V_HH и фибера аденовируса человека серотипа 5, анализировали методом ПЦР со специфическими праймерами, а также с помощью рестрикционного картирования с использованием рестриктазы HindIII, что позволяет получить характерную для генома аденовируса человека рестрикционную картину.

Клетки HEK-293 трансфицировали расщепленной по сайту PacI плазмидой, содержащей геном рекомбинантного аденовируса с делецией области E1 и встроенной вместо нее кассеты экспрессии с трансгеном. Полученный рекомбинантный аденовирус Ad5-аСyК-V_HH анализировали методом ПЦР с использованием пары праймеров, комплементарных целевому гену, гену гексона аденовируса человека серотипа 5, а также области E1 аденовируса, для контроля возможного присутствия репликативно-компетентных вирусных частиц.

Детекция экспрессии гена нанoантитела в составе рекомбинантных аденовирусов Ad5-аСyК-V_HH

Экспрессию целевого гена в составе рекомбинантного аденовируса человека серотипа 5 Ad5-аСyК-V_HH анализировали на уровне мРНК. С этой целью клетки линии HEK-293, перmissive для аденовируса человека серотипа 5, заражали рекомбинантным вирусом Ad5-аСyК-V_HH. Суммарную РНК зараженных клеток использовали для получения кДНК, которую анализировали методом ПЦР с праймерами, специфическими к последовательности гена нанoантитела к цитокератину-8 мыши, к вирусной ДНК и конститутивно экспрессируемому гену глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (GAPDH). В качестве отрицательного контроля использовали клетки линии HEK-293, зараженные вирусом Ad-null (рис. 2А). В результате ОТ-ПЦР показано, что рекомбинантный аденовирусный вектор экспрессирует мРНК гена нанoантитела к цитокератину и может использоваться для анализа продукции белка.

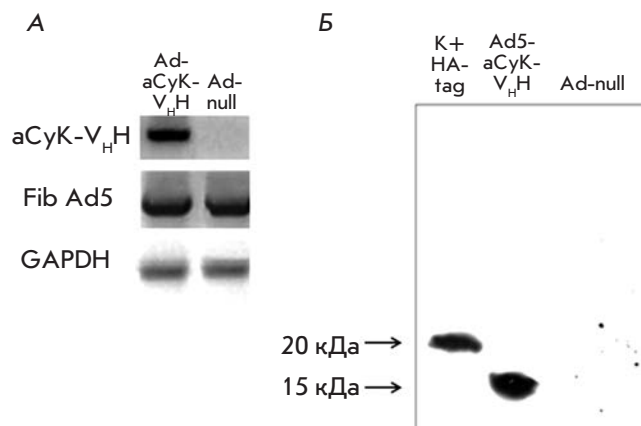


Рис. 2. Анализ экспрессии нанoантитела рекомбинантным аденовирусным вектором. А – Методом обратной транскрипции и последующей ПЦР с праймерами, специфическими к последовательности гена нанoантитела (аСyК-V_HH), гена фибера аденовируса человека серотипа 5 (Fib Ad5) и конститутивно экспрессируемого гена GAPDH, показана экспрессия нанoантитела на уровне РНК в клетках, инфицированных рекомбинантным аденовирусом Ad5-аСyК-V_HH. В качестве контроля специфичности ПЦР-анализа использовали РНК клеток, инфицированных аденовирусным вектором без трансгена (Ad-null). Б – Вестерн-блот-анализ экспрессии нанoантитела клетками, инфицированными рекомбинантным аденовирусом Ad5-аСyК-V_HH и Ad-null. Гибридизация с коммерческими антителами к HA-эпитопу вируса гриппа выявила синтез белка 15 кДа в культуральной жидкости инфицированных аденовирусом Ad5-аСyК-V_HH клеток. В качестве контроля образования комплекса антиген (HA-эпитоп)–антитело (анти-HA–конъюгат) использовали охарактеризованный рекомбинантный белок, содержащий HA-эпитоп (нанoантитело, наработанное в бактериях и содержащее помимо HA-эпитопа полигистидиновую последовательность (His₆-tag)).

Экспрессию нанoантитела на уровне трансляции анализировали в клетках H1299, инфицированных рекомбинантным аденовирусом, несущим ген нанoантитела аСyК-V_HH, меченного HA-эпитопом вируса гриппа (Ad5-аСyК-V_HH), и рекомбинантным аденовирусом, содержащим кассету экспрессии без трансгена (Ad-null). Присутствие нанoантитела в культуральной среде зараженных клеток определяли методом иммуноблотинга с антителами к HA-эпитопу вируса гриппа, конъюгированными с пероксидазой хрена (рис. 2Б).

Биологическая активность

Специфичность экспрессируемого аденовирусным вектором нанoантитела к цитокератину подтверж-

дали, сравнивая взаимодействие с антигеном белков культуральной жидкости от инфицированных рекомбинантным аденовирусом клеток и очищенного из периплазмы клеток *E. coli* наноантитела.

Лизаты клеток печени и головного мозга мыши фракционировали в полиакриламидном геле, переносили на ПВДФ-мембрану, которую инкубировали с культуральной средой клеток, инфицированных Ad5-аСyK-V_HN. Экспрессируемое наноантитело служило первичным антителом к белку-мишени (цитокератин-8 мыши, 55 кДа), выявляемому в суммарном лизате. Параллельно мембрану инкубировали с антителами аСyK-V_HN, полученными в периплазме клеток *E. coli*.

На рис. 3 представлены результаты электрофореза белковых лизатов в полиакриламидном геле и иммуноблотинга с наноантителами аСyK-V_HN после проявления вторичными антителами к НА-эпитопу вируса гриппа, конъюгированными с пероксидазой хрена.

Результаты иммуноблотинга свидетельствуют о том, что экспрессируемое аденовирусом наноантитело обладает такой же специфичностью, как и синтезируемое в периплазме клеток *E. coli*, ген которого клонировали в рекомбинантном аденовирусе.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время существует ряд технологий получения мини-антител с заданной специфичностью. Сравнительно недавно обнаружено, что у представителей семейства Camelidae (Верблюдовые) помимо классических антител в относительно больших количествах образуются функционально активные неканонические одноцепочечные антитела. Это позволяет получать мини-антитела на основе библиотек генов антигенузнающих доменов одноцепочечных антител иммунизированных животных. Неканонические антитела состоят из димера только одной укороченной тяжелой цепи иммуноглобулина (без легких цепей). Однодоменные мини-антитела (наноантитела) являются генно-инженерными производными антигенузнающих доменов этих неканонических антител. Отбор клонов мини-антител с заданной специфичностью из библиотеки последовательностей всего репертуара антигенузнающих доменов неканонических антител иммунизированного верблюда основан на высокоэффективной процедуре функциональной селекции частиц нитчатого фага, содержащих как экспонированное на поверхности мини-антитело, так и кодирующую его ДНК в составе фаговой частицы («фаговый дисплей»).

Полученные по этой технологии мини-антитела обладают высокой стабильностью, растворимостью, низкой иммуногенностью. Мини-антитела могут быть

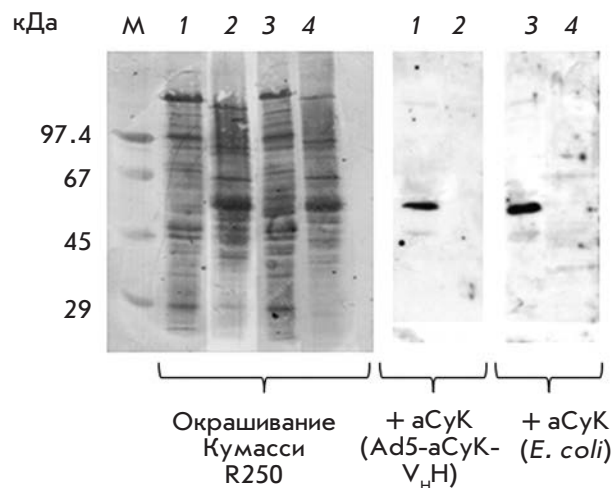


Рис. 3. Подтверждение функциональной активности наноантитела методом иммуноблотинга. Разделенный электрофорезом в полиакриламидном геле экстракт белков клеток печени (дорожки 1 и 3) и головного мозга мыши (дорожки 2 и 4) переносили на ПВДФ-мембрану, после чего детектировали специфическое взаимодействие наноантител, экспрессируемых рекомбинантным аденовирусным вектором и полученных в периплазме клеток *E. coli*, с белком-мишенью (~ 55 кДа).

получены (отобраны) к разнообразным эпитопам антигенов, в том числе и к консервативным, которые зачастую невозможно получить по традиционной технологии. Поскольку для каждого мини-антитела известна кодирующая его нуклеотидная последовательность, возможно получение соответствующего белка в любой из известных систем экспрессии (прокариотических и эукариотических).

Экономически наиболее оправдано получение белковых препаратов мини-антител в клетках *E. coli*, в дрожжах или в клетках СНО. При введении таких препаратов экспериментальным животным (или пациентам) следует учитывать очень короткое время их жизни в организме (менее 24 ч). Увеличить период терапевтического действия препаратов на основе мини-антител можно с помощью векторных систем, обеспечивающих синтез действующего вещества непосредственно в инфицированных клетках организма. Оптимальной системой экспрессии для решения таких задач являются рекомбинантные аденовирусы. Их безопасность и эффективность доказана в ходе целого ряда клинических испытаний, проводимых во всем мире, а период продукции ими целевого белка составляет около 20 дней.

Возможность использования рекомбинантных аденовирусных векторов для экспрессии генов анти-

генузнающих фрагментов одноцепочечных антител двугорбого верблюда исследована в нашей работе. Нами показана возможность экспрессии гена наноантитела с использованием аденовирусного вектора. Экспрессия трансгена подтверждена на уровне РНК-транскрипта и белкового продукта. Специфическое взаимодействие секретируемого эукариотическими клетками наноантитела с белком-мишенью свидетельствует о сохранении его функциональной активности. Для количественной оценки эффективности экспрессии наноантител с использованием рекомбинантного аденовируса необходимы дальнейшие исследования.

ВЫВОДЫ

Доставка гена однодоменного мини-антитела (наноантитела), отобранного из библиотеки последовательностей переменных доменов особых одноцепочечных антител иммунизированного верблюда, в эукариотические клетки с помощью рекомбинантного аденовирусного вектора обеспечивает эффективную экспрессию и функциональность наноантитела. Результаты работы могут быть использованы при создании средств пассивной иммунизации для защиты от патогенов или при создании нового поколения иммунобиологических противотоксических препаратов. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Деев С.М., Лебедев Е.Н. // *Acta Naturae*. 2009. Т. 1. № 1. С. 32–50.
2. Stern M., Herrmann R. // *Critical Rev. Oncol./Hematol.* 2005. V. 54. P. 11–29.
3. Robinson C.R., Sauer R.T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. V. 95. P. 5929–5934.
4. Worn A., Pluckthun A. // *J. Mol. Biol.* 2001. V. 305. P. 989–1010.
5. Hamers-Casterman C., Atarhouch T., Muyldermans S., Robinson G., Hamers C., Songa E.B., Bendahman N., Hamers R. // *Nature*. 1993. V. 363. P. 446–448.
6. Тиллиб С.В. // *Молекуляр. биология*. 2011. Т. 45. № 1. С. 77–85.
7. van der Linden R.H., Frenken L.G., de Geus B., Harmsen M.M., Ruuls R.C., Stok W., de Ron L., Wilson S., Davis P., Verrips C.T. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1999. V. 1431. P. 37–46.
8. Vincke C., Loris R., Saerens D., Martinez-Rodriguez S., Muyldermans S., Conrath K. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. P. 3273–3284.
9. Ghassabeh G., Muyldermans S., Saerens D. // *Curr. Trends Monoclonal Antibody Development and Manufacturing*. / Ed. Shire S.J. N.Y.: Springer, 2010. P. 29–48.
10. Campana V., Zentilin L., Mirabile I., Kranjc A., Casanova P., Giacca M., Prusiner S.B., Legname G., Zurzolo C. // *Biochem. J.* 2009. V. 418. P. 507–515.
11. Zuber C., Mitteregger G., Schuhmann N., Rey C., Knackmuss S., Rupprecht W., Reusch U., Pace C., Little M., Kretzschmar H.A., et al. // *J. Gen. Virol.* 2008. V. 89. P. 2055–2061.
12. Шмаров М.М., Седова Е.С., Верховская Л.В., Руднева И.А., Богачева Е.А., Барыкова Ю.А., Щербинин Д.Н., Лысенко А.А., Тутыхина И.Л., Логунов Д.Ю. и др. // *Acta Naturae*. 2010. Т. 2. № 1. С. 119–126.
13. Tutukhina I.L., Bezborodova O.A., Shmarov M.M., Logunov D.Y., Neugodova G.L., Nemtsova E.R., Naroditsky B.S., Yakubovskaya R.I., Gintsburg A.L. // *Protein Expr. Purif.* 2009. V. 65. P. 100–107.
14. Тутыхина И.Л., Безбородова О.А., Верховская Л.В., Шмаров М.М., Логунов Д.Ю., Немцова Е.Р., Народицкий Б.С., Якубовская Р.И., Гинцбург А.Л. // *Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология*. 2009. № 1. С. 27–31.
15. Tutukhina I.L., Logunov D.Y., Shcherbinin D.N., Shmarov M.M., Tikhvatulin A.I., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L. // *J. Mol. Med.* 2011. V. 89. P. 331–341.
16. Arafat W.O., Gómez-Navarro J., Buchsbaum D.J., Xiang J., Wang M., Casado E., Barker S.D., Mahasreshti P.J., Haisma H.J., Barnes M.N., et al. // *Gene Therapy*. 2002. V. 9. P. 256–262.
17. Kasuya K., Boyer J.L., Tan Y., Alipui D.O., Hackett N.R., Crystal R.G. // *Mol. Therapy*. 2005. V. 11. P. 237–244.
18. Rothbauer U., Zolghadr K., Tillib S., Nowak D., Schermelleh L., Gahl A., Backmann N., Conrath K., Muyldermans S., Cardoso M.C., et al. // *Nature Meth.* 2006. V. 3. P. 887–889.

УДК 57.052.6

Белок рабин-8 взаимодействует с GTP-азой Rheb и ингибирует фосфорилирование Ser235/Ser236 в белке S6 малой рибосомной субъединицы

А. А. Пархитко^{1,2,3*}, О. О. Фаворова¹, Е. Р. Henske^{2,3}¹ГБОУ ВПО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздравсоцразвития РФ, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1²Fox Chase Cancer Center, 333 Cottman Avenue, Philadelphia, USA, 19111³Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, 1 Blackfan Circle, Boston, USA, 02155

*E-mail: parhitko@mail.ru

Поступила в редакцию 18.05.2011 г.

РЕФЕРАТ Серин/треониновая протеинкиназа mTOR, взаимодействуя с белками Raptor, mLST8, PRAS40 и Deptor, образует киназный комплекс mTORC1, играющий ключевую роль в регуляции биосинтеза белков, транскрипции, клеточного метаболизма, апоптоза и аутофагии, в частности посредством направленного фосфорилирования киназ белка S6 малой рибосомной субъединицы. Известно, что киназный комплекс mTORC1 активируется факторами роста и аминокислотами через активацию GTP-азы Rheb. В представленной работе впервые показано, что сверхэкспрессия в культуре клеток эмбриональной почки человека белка Rabin8 (далее – рабин-8), функционирующего в качестве фактора обмена гуаниновых нуклеотидов для GTP-азы Rab8, приводит к снижению фосфорилирования Ser235/Ser236 в рибосомном белке S6. Напротив, снижение экспрессии белка рабин-8 с помощью малых интерферирующих РНК (siРНК, small interfering RNA) приводит к повышению уровня фосфорилирования Ser235/Ser236 в белке S6. Показано также, что рабин-8 связывается с GTP-азой Rheb. Полученные результаты могут свидетельствовать о существовании ранее неизвестного механизма модуляции функциональной активности киназного комплекса mTORC1 и о регуляции управляемых им процессов, в первую очередь биосинтеза белков. Принимая во внимание роль рабина-8 как одного из важных регуляторов процесса образования клеточной реснички (цилиогенеза), можно предположить существование связи между этими процессами и образованием первичной реснички.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА комплекс mTORC1, Rheb, рабин-8, белок S6 малой рибосомной субъединицы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ДМЕМ – питательная среда Игла в модификации Дульбекко; ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка; GAP-белки – активирующие GTP-азу белки; mTOR – протеинкиназа, мишень для рапамицина у млекопитающих (mammalian target of rapamycin); Rheb – GTP-аза, гомолог белка Ras (Ras homolog enriched in brain); siРНК – малые интерферирующие РНК; TBST – буфер для блотинга (Tris-Buffered Saline and Tween 20).

ВВЕДЕНИЕ

Высококонсервативная серин/треониновая протеинкиназа mTOR (mammalian target of rapamycin, мишень для рапамицина у млекопитающих) принадлежит к семейству фосфатидилинозитолкиназ PIKK (phosphatidylinositol 3' kinase-related kinases) и является ключевым ферментом mTOR-сигнального пути, регулирующего накопление клеточной массы у многих эукариот. В качестве каталитической субъединицы mTOR входит в состав

двух функционально различных гетероолигомерных комплексов: mTORC1 и mTORC2. mTORC1 представляет собой функциональный димер, содержащий по две субъединицы каждого из белков: mTOR, Raptor (regulatory associated protein of mTOR), mLST8 (mammalian lethal with sec-13), PRAS40 (proline-rich AKT substrate 40 kDa) и Deptor (DEP-domain-containing mTOR-interacting protein) [1, 2]. Основная функция mTORC1 – фосфорилирование в ответ на сигналы внешней среды широкого спек-

тра эффекторов, регулирующих процессы белкового синтеза, клеточного деления, апоптоза и аутофагии [3, 4]. mTORC1 регулирует трансляцию путем прямого фосфорилирования белка 4E-ВР (translation initiation factor 4E binding protein), связывающегося с фактором инициации 4Е, и киназ S6K1 и S6K2 белков S6 малой рибосомной субъединицы [5]. Эти киназы, в свою очередь, активируют процессы трансляции, фосфорилируя белок S6, а также ряд других белков (SKAR, PDCD4, eEF-2K, eIF4B). Определение уровня фосфорилирования белка S6 с помощью фосфоспецифических антител против Ser235/Ser236 используется для оценки киназной активности комплекса mTORC1 [6].

Активность комплекса mTORC1 регулируется множеством различных стимулов, таких, как ростовые факторы, аминокислоты, глюкоза и кислород. При этом используются два основных механизма – направленные модификации компонентов этого комплекса или регуляция GTP-азы Rheb, которая в связанном с GTP состоянии взаимодействует непосредственно с mTORC1 и активирует его. Основной регулятор GTP-азы Rheb – это гетеродимерный комплекс, который состоит из двух белков-супрессоров опухолевого роста: активирующего GTP-азу белка (GAP-белка) туберина и гамартина, стимулирующего переход GTP-азы Rheb из активной GTP-связанной формы в неактивную GDP-связанную. Их инактивация приводит к тому, что GTP-аза Rheb находится в стабильно активной форме и активирует комплекс mTORC1. В результате повышается белоксинтезирующая активность и наблюдается неконтролируемое деление клеток [7].

Показано также, что туберин и гамартин влияют на формирование первичной реснички [8]. В образовании первичной реснички участвует и GTP-аза Rab8, и взаимодействующий с ней фактор обмена гуаниновых нуклеотидов рабин-8 [9], который активирует Rab8, стимулируя высвобождение GDP и связывание GTP [10].

Исходя из сказанного, мы предположили, что рабин-8 также может выполнять роль регулятора GTP-азы Rheb, участвующей в работе комплекса mTORC1. В представленной работе показано, что сверхэкспрессия белка рабин-8 приводит к снижению активности комплекса mTORC1, а подавление с помощью siРНК синтеза рабина-8, как и туберина, приводит к активации mTORC1. Методом коиммунопреципитации показано, что белок рабин-8 действительно взаимодействует с GTP-азой Rheb. На основе представленных данных можно заключить, что белок рабин-8, связываясь с GTP-азой Rheb, действует как негативный регулятор киназного комплекса mTORC1.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы и препараты

Культуру клеток эмбриональной почки человека HEK293 (АТСС, США) культивировали в среде ДМЕМ с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) («Gibco», США) или без нее. Использовали антитела к белку рабин-8 («Proteintech», США), туберину («Abcam»), Мус, β-актину и mTOR, фосфоспецифические антитела к Ser235/Ser236 рибосомного белка S6 («Cell Signaling», США) и кроличьи IgG («Santa Cruz Biotechnology», США).

Трансфекция

Для трансфекции культуры клеток HEK293 плазмидными конструкциями использовали реагент Eugene 6 («Roche», США), а различными siРНК – Trans-IT ТКО («Mirus», США) в соответствии с рекомендациями производителей. Клетки HEK293 трансфицировали контрольным вектором pcDNA3.1, вектором, экспрессирующим рабин-8, контрольным вектором pCMVTag3A или вектором, экспрессирующим слитый белок Мус-Rheb, порознь или попарно. Через 24 ч после трансфекции клетки дважды промывали и добавляли среду с ростовыми факторами или без них. Через 24 ч после замены среды киназную активность комплекса mTORC1 анализировали по уровню фосфорилирования рибосомного белка S6 с помощью иммуноблотинга с использованием фосфоспецифических антител против Ser235/Ser236 белка S6. Клетки HEK293 также трансфицировали контрольной siРНК, siРНК против mРНК белка рабин-8 или туберина («Dharmacon», США), и через 24 ч после трансфекции клетки дважды промывали и добавляли среду с ростовыми факторами или без них.

Коиммунопреципитация

С целью изучения возможности коиммунопреципитации белка рабин-8 с Мус-Rheb и реципрокной коиммунопреципитации белка Мус-Rheb с белком рабин-8 и киназой mTOR клетки обрабатывали буфером для лизиса («Cell Signaling», США). Клеточные экстракты инкубировали с антителами к рабину-8 или Мус в течение 12 ч при 4°C. Полученные комплексы осаждали инкубацией с белок-А-агарозой в течение 1 ч при 4°C с последующим центрифугированием. Белки элюировали, добавляя буфер Лэммли, наносили на денатурирующий градиентный 4–20% полиакриламидный гель и после электрофореза переносили на поливиниловые мембраны (Immobilon-P, «Millipore», США). Мембраны выдерживали в буфере TBST (137 mM NaCl, 0.1% Твин-20, 20 mM Трис, pH 7.6) («Cell Signaling», США), содержащем 5% сухого молока, в течение 1 ч, а затем инкубировали с вы-

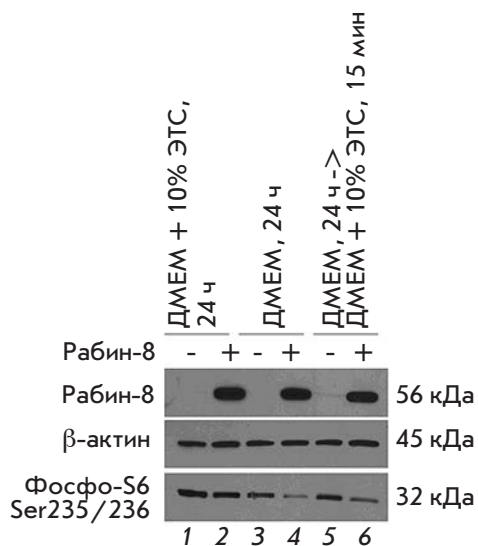


Рис. 1. Сверхэкспрессия рабина-8 в культуре клеток HEK293 снижает активность киназного комплекса mTORC1. Клетки трансфицировали контрольным вектором pcDNA3.1 (дорожки 1, 3, 5) или вектором, экспрессирующим рабин-8 (дорожки 2, 4, 6). Активность mTORC1 анализировали по уровню фосфорилирования рибосомного белка S6 с помощью иммуноблотинга с фосфоспецифическими антителами против S6 (Ser235/Ser236) в среде, содержащей ростовые факторы (дорожки 1, 2), в отсутствие ростовых факторов (дорожки 3, 4) и при стимуляции клеток, выдержанных в течение 24 ч в среде без ростовых факторов, средой с ростовыми факторами в течение 15 мин (дорожки 5, 6). Уровни рабина-8 и β-актина оценивали методом иммуноблотинга со специфическими антителами.

бранными первичными антителами при 4°C в течение ночи, промывали 2 раза по 5 мин в буфере TBST и добавляли соответствующие вторичные антитела («Amersham», США). Мембраны промывали 3 раза по 10 мин в буфере TBST, хемилюминесцентный сигнал регистрировали при экспозиции с рентгеновской пленкой («Kodak», США), используя набор для хемилюминесценции («Perkin-Elmer», США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Рабин-8 снижает активность киназного комплекса mTORC1

Роль белка рабин-8 в регуляции активности комплекса mTORC1 мы выясняли с использованием наиболее часто применяемой в таких опытах клеточной линии HEK293 [11]. Клетки трансфицировали контрольным вектором pcDNA3.1 (рис. 1, дорожки 1, 3, 5) или вектором, экспрессирующим рабин-8 (рис. 1, дорожки 2, 4, 6). В случае контрольного вектора при наличии в среде ростовых факторов (рис. 1, дорожка 1) ком-

плекс mTORC1 активирован, о чем свидетельствует уровень фосфорилирования рибосомного белка S6 (нижняя панель). В отсутствие ростовых факторов (рис. 1, дорожка 3) происходит частичное ингибирование киназной активности mTORC1, а последующая кратковременная стимуляция клеток, выдержанных в таких условиях, средой, содержащей ростовые факторы (рис. 1, дорожка 5), приводит к полной реактивации комплекса mTORC1. Высокий уровень белка рабин-8, обусловленный трансфекцией клеток вектором, экспрессирующим рабин-8 (верхняя панель), не влиял на активность киназного комплекса mTORC1 (рис. 1, дорожка 2) в среде, содержащей ростовые факторы, но приводил к снижению активности mTORC1 в их отсутствие (рис. 1, дорожка 4) и при реактивации этого комплекса средой, содержащей ростовые факторы (рис. 1, дорожка 6).

Ингибирование экспрессии рабина-8 или туберина приводит к активации киназного комплекса mTORC1

Полученные при сверхэкспрессии рабина-8 данные о влиянии этого белка на активность киназного комплекса mTORC1 мы подтверждали с использованием siРНК – коротких синтетических РНК-дуплексов, которые в составе комплекса со специальными белками вызывают направленную деградацию комплементарной им мРНК. В качестве отрицательного и положительного контролей использовали siРНК, не имеющую комплементарной последовательности в геномных мРНК человека (контрольная siРНК), и siРНК против мРНК туберина – белка, который, как указывалось выше, образует гетеродимерный комплекс с гамартином. Этот комплекс ингибирует активность GTP-азы Rheb и соответственно киназного комплекса mTORC1. При трансфекции клеток контрольной siРНК (рис. 2, дорожки 1, 4, 7) так же, как и при трансфекции контрольным вектором (см. рис. 1), присутствие в среде ростовых факторов (рис. 2, дорожка 1) приводит к активации киназы mTORC1. В отсутствие ростовых факторов (рис. 2, дорожка 4) наблюдается ингибирование киназной активности mTORC1. При кратковременной (15 мин) стимуляции средой с ростовыми факторами клеток, выдержанных в среде без ростовых факторов в течение 24 ч (рис. 2, дорожка 7), происходит реактивация комплекса mTORC1. Снижение экспрессии как туберина, так и белка рабин-8, наблюдаемое при трансфекции siРНК против мРНК этих белков, стимулировало активность mTORC1 при наличии в среде ростовых факторов (рис. 2, дорожки 2, 3). В отсутствие ростовых факторов активность комплекса mTORC1 в клетках, трансфицированных siРНК против мРНК туберина, незначительно увеличивалась

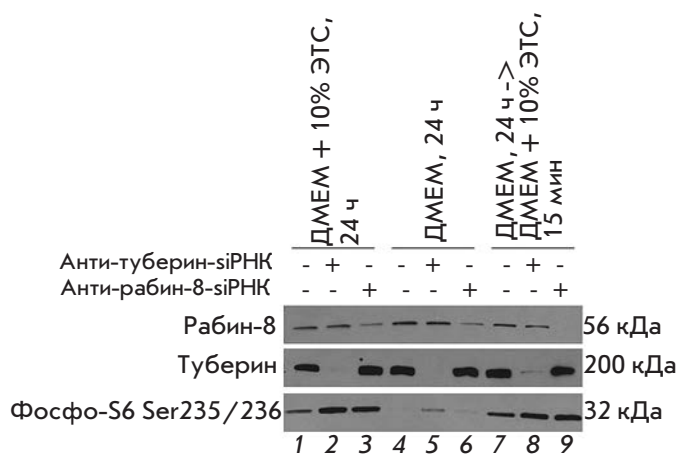


Рис. 2. Ингибирование экспрессии белка рабин-8 или туберина приводит к активации киназного комплекса mTORC1. Ингибирование экспрессии белка рабин-8 по механизму РНК-интерференции в культуре клеток HEK 293 приводит к активации киназного комплекса mTORC1 (дорожки 3, 9), как и в положительном контроле с антитубериновой siРНК (дорожки 2, 8). Активность комплекса mTORC1 анализировали как на рис. 1 в среде, содержащей ростовые факторы (дорожки 1–3), в отсутствие ростовых факторов (дорожки 4–7) и при стимуляции клеток, выдержанных в течение 24 ч в среде без ростовых факторов, средой с ростовыми факторами в течение 15 мин (дорожки 7–9). Уровни рабина-8 и туберина оценивали методом иммуноблоттинга со специфическими антителами. Контрольная siРНК – дорожки 1, 4, 7.

(рис. 2, дорожка 5). При трансфекции siРНК против мРНК рабина-8 активность mTORC1 не изменялась (рис. 2, дорожка 6) по сравнению с трансфекцией контрольной siРНК, а при реактивации средой, содержащей ростовые факторы, активность mTORC1 была выше, чем в контроле (рис. 2, дорожки 8, 9).

Коиммунопреципитация белков рабин-8, Rheb и mTOR

Как следует из полученных нами результатов, рабин-8 является негативным регулятором киназного комплекса mTORC1. Возможность взаимодействия между рабином-8, Rheb и mTOR мы изучали при помощи трансфекции культуры клеток HEK293 одновременно контрольными векторами pCDNA3.1 и pCMVTag3A (рис. 3А, дорожка 1) или двумя векторами, экспрессирующими рабин-8 и слитый белок Мус-Rheb (рис. 3А, дорожки 2–4), в среде, содержащей (рис. 3А, дорожки 1, 2) или не содержащей ростовые факторы (рис. 3А, дорожка 3), а также при последующей кратковременной стимуляции клеток,

выдержанных в течение 24 ч без ростовых факторов, средой, содержащей ростовые факторы (рис. 3А, дорожка 4). Для изучения взаимодействия рабина-8 и Rheb мы провели коиммунопреципитацию клеточных лизатов с антителами против рабина-8 и последующий иммуноблоттинг с антителами против эпитопа Мус слитого белка Мус-Rheb (рис. 3Б). Оказалось, что взаимодействие Rheb с рабином-8 не зависит от присутствия ростовых факторов в среде (рис. 3Б, дорожки 2–4). При этом мы не обнаружили Rheb при иммунопреципитации с антителами против рабина-8 в контрольном лизате без экспрессии Мус-Rheb (рис. 3Б, дорожка 1) или в лизате, в котором для коиммунопреципитации использовали неспецифические контрольные кроличьи IgG (рис. 3Б, дорожка 5). Чтобы подтвердить взаимодействие белков рабин-8 и Rheb, мы провели реципрокную коиммунопреципитацию. Клеточные лизаты инкубировали с антителами против эпитопа Мус слитого белка Мус-Rheb, а для последующего иммуноблоттинга использовали антитела против mTOR и рабина-8. Как и ожидалось, Rheb и mTOR взаимодействовали в присутствии ростовых факторов в среде (рис. 3Б, дорожки 2 и 4). Rheb и рабин-8 также взаимодействовали между собой в среде, содержащей ростовые факторы (рис. 3Б, дорожки 2 и 4), однако в отсутствие ростовых факторов мы не обнаружили как взаимодействия Rheb с рабином-8, так и Rheb с mTOR (рис. 3Б, дорожка 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

В представленной работе мы впервые показали, что рабин-8 регулирует фосфорилирование Ser235/Ser236 в рибосомном белке S6. Ранее было установлено, что Ser235/Ser236 фосфорилируется протеинкиназой S6K1 в результате активации киназного комплекса mTORC1, а ингибитор mTORC1, рапамицин, полностью блокирует фосфорилирование этих остатков при любых условиях [2]. В соответствии с этим уровень фосфорилирования Ser235/Ser236 в белке S6 можно рассматривать как удобный индикатор киназной активности mTORC1. Полученные нами данные позволяют предположить, что рабин-8 регулирует активность этого комплекса. Однако роль фосфорилирования белка S6 в регуляции белкового синтеза до конца не установлена. Так, получили линии мышей, в белке S6 у которых все подвергающиеся фосфорилированию аминокислотные остатки заменили нефосфорилируемыми остатками аланина, однако, уровень белкового синтеза в клетках различного типа у этих мышей остался таким же, как у мышей дикого типа [12].

Мы определяли уровень фосфорилирования Ser235/Ser236 белка S6 в различных условиях: при росте клеток в среде, содержащей ростовые фак-

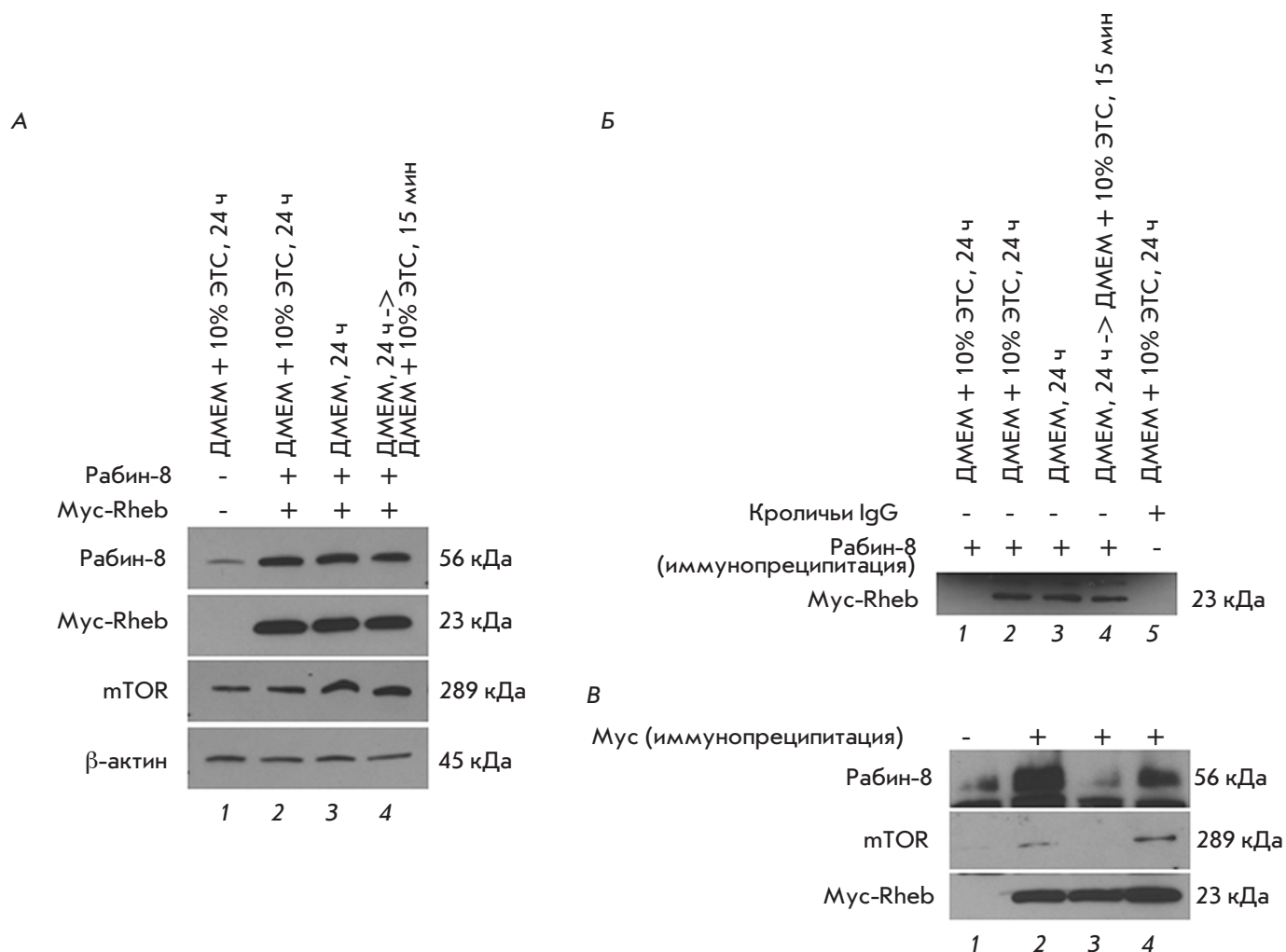


Рис. 3. Коиммунопреципитация белков рабин-8 и Rheb, экспрессированных в клетках HEK293 после их трансфекции соответствующими векторами. Уровни рабина-8, туберина, mTOR и β-актина оценивали методом иммуноблотинга со специфическими антителами. **А** – Уровень экспрессии белков рабин-8, Мус-Rheb и mTOR после котрансфекции клеток контрольными векторами pcDNA3.1 и pCMVTag3A (дорожка 1) или векторами, экспрессирующими рабин-8 и слитый белок Мус-Rheb (дорожки 2–4), в среде с ростовыми факторами (дорожки 1, 2), без ростовых факторов (дорожка 3) и при стимуляции клеток, выдержанных в течение 24 ч в среде без ростовых факторов, средой с ростовыми факторами в течение 15 мин (дорожка 4). **Б** – Коиммунопреципитация лизатов как на рис. 3А с использованием антител к белку рабин-8 (дорожки 1–4) или с контрольными кроличьими IgG-антителами (дорожка 5) и последующим иммуноблотингом с антителами против Мус. Для иммунопреципитации с контрольными кроличьими IgG использовали лизат как на рис. 3А (дорожка 2). **В** – Коиммунопреципитация лизатов как на рис. 3А с использованием антител против эпитопа Мус и последующего иммуноблотинга с антителами против рабина-8, mTOR и Мус.

торы (ДМЕМ + 10% ЭТС), при выдерживании клеток в среде без ростовых факторов (ДМЕМ), а также при кратковременной стимуляции ростовыми факторами (ДМЕМ → ДМЕМ + 10% ЭТС) клеток, выдержанных в среде, не содержащей ростовые факторы. Так как регуляция киназного комплекса mTORC1 осуществляется на нескольких уровнях, использование различных условий роста позволяет лучше понять механизмы регуляции [13]. Во всех случаях

мы использовали среду ДМЕМ, содержащую аминокислоты, поскольку отсутствие аминокислот приводит к полному ингибированию киназного комплекса mTORC1 независимо от его негативного регулятора туберина [14]. В отсутствие ростовых факторов происходит активация GAP-белка туберина, стимулирующего переход GTP-азы Rheb из активной GTP-связанной в неактивную GDP-связанную форму, что приводит к ингибированию киназного комплекса

mTORC1 [15, 16]. В этих условиях любые изменения, ингибирующие GAP-активность туберина или независимо от туберина стимулирующие переход GTP-азы Rheb в активное состояние, будут активировать киназный комплекс mTORC1, что мы и наблюдали. Мы также использовали кратковременную стимуляцию ростовыми факторами клеток, выдержанных в среде без ростовых факторов, для дифференциации изменений активности киназного комплекса mTORC1, протекающих с разной скоростью. Мы обнаружили, что при росте клеток в полной среде, содержащей ростовые факторы, снижение экспрессии рабина-8 стимулировало активность mTORC1, но сверхэкспрессии рабина-8 недостаточно для ингибирования этого комплекса. В среде без ростовых факторов снижения экспрессии рабина-8 недостаточно для реактивации комплекса mTORC1, но сверхэкспрессия рабина-8 усиливает ингибирование киназного комплекса mTORC1. Сверхэкспрессия рабина-8 замедляла реактивацию киназного комплекса mTORC1, вызванную кратковременной стимуляцией средой с ростовыми факторами, при том, что снижение экспрессии рабина-8 стимулировало реактивацию. Эти результаты позволяют предположить, что рабин-8 подавляет активацию киназного комплекса mTORC1 ростовыми факторами.

Мы впервые показали, что рабин-8 связывается с основным регулятором киназного комплекса mTORC1 – GTP-азой Rheb, что важно для понимания механизма регуляции mTORC1 белком рабин-8. Однако нельзя исключить, что рабин-8 может взаимодействовать и с другими компонентами комплекса mTORC1, так как при иммунопреципитации мы смогли обнаружить в комплексе с рабином-8 и Rheb каталитическую субъединицу mTOR. Не исключена возможность и того, что рабин-8 может опосредованно взаимодействовать с Rheb – через неизвестный белок или в комплексе с туберином или гамартином. Однако, учитывая, что оба белка – и Rab8, и Rheb, относятся к семейству GTP-аз и участвуют в регуляции образования первичной реснички [9], мы предполагаем, что рабин-8 влияет на активность киназного комплекса mTORC1 через GTP-азу Rheb. В пользу этого предположения свидетельствуют также опыты по коиммунопреципитации, когда, используя антитела против эпитопа Мус в белке Мус-Rheb, мы не об-

наружили ослабления взаимодействия между белками рабин-8 и Rheb в среде без ростовых факторов. При этом взаимодействие между Rheb и mTOR было нарушено, что согласуется с ранее опубликованными данными [1]. Мы не обнаружили взаимодействия между белками рабин-8 и Rheb в опытах по реципрокной коиммунопреципитации с белками против рабина-8, что может объясняться разной аффинностью антител к данным белкам.

Возможность взаимодействия белков рабин-8 и Rheb позволяет предположить новый Rheb-зависимый механизм регуляции образования первичной реснички, не зависящий от активности киназного комплекса mTORC1 [8]. Согласно этому предположению, при взаимодействии Rheb и рабина-8 происходит перераспределение функции Rheb от регуляции комплекса mTORC1 к регуляции образования первичной реснички. В последнее время была обнаружена связь между нарушениями функции цилиогенеза и различными заболеваниями, выделенными в отдельную группу цилиопатий. К заболеваниям этой группы относятся, в частности, поликистозная болезнь почек, синдром Барде-Бидля и другие [17]. Недавно выявили связь между нарушениями цилиогенеза и ожирением [18]. Помимо этого, первичная ресничка регулирует активность сигнальных путей Hedgehog и Wnt, нарушение которых связано с развитием опухолей в различных органах [19]. Стоит также отметить, что активация киназного комплекса mTORC1 наблюдается во многих типах опухолей [20] и необходима для их прогрессии. Следовательно, понимание механизмов регуляции и взаимосвязи комплекса mTORC1 и процессов образования первичной реснички должно привести к появлению новых подходов к лечению цилиопатий, ожирения и онкологических заболеваний. ●

Работа выполнена в рамках межинститутского сотрудничества между Российским государственным медицинским университетом им. Н.И. Пирогова (кафедра молекулярной биологии и медицинской биотехнологии) и Фокс-Чейзовским онкологическим центром (США, Филадельфия). Авторы благодарят О.Г. Кулакову и Д.И. Хабибуллина за полезные обсуждения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sengupta S., Peterson T.R., Sabatini D.M. // Mol. Cell. 2010. V. 40. P. 310–322.
2. Zoncu R., Efeyan A., Sabatini D.M. // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2011. V. 12. P. 21–35.
3. Chan E.Y. // Sci. Signaling. 2009. V. 2. P. pe51.
4. Mizushima N. // Curr. Opin. Cell Biol. 2010. V. 22. P. 132–139.
5. Wullschlegel S., Loewith R., Hall M.N. // Cell. 2006. V. 124. P. 471–484.
6. Ma X.M., Blenis J. // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2009. V. 10. P. 307–318.
7. Astrinidis A., Henske E.P. // Oncogene. 2005. V. 24. P. 7475–7481.

8. Hartman T.R., Liu D., Zilfou J.T., Robb V., Morrison T., Watnick T., Henske E.P. // *Hum. Mol. Genet.* 2009. V. 18. P. 151–163.
9. Nachury M.V., Loktev A.V., Zhang Q., Westlake C.J., Peranen J., Merdes A., Slusarski D.C., Scheller R.H., Bazan J.F., Sheffield V.C., et al. // *Cell.* 2007. V. 129. P. 1201–1213.
10. Hattula K., Furuholm J., Arffman A., Peranen J. // *Mol. Biol. Cell.* 2002. V. 13. P. 3268–3280.
11. Sancak Y., Bar-Peled L., Zoncu R., Markhard A.L., Nada S., Sabatini D.M. // *Cell.* 2010. V. 141. P. 290–303.
12. Ruvinsky I., Sharon N., Lerer T., Cohen H., Stolovich-Rain M., Nir T., Dor Y., Zisman P., Meyuhos O. // *Genes Dev.* 2005. V. 19. P. 2199–2211.
13. Peterson T.R., Laplante M., Thoreen C.C., Sancak Y., Kang S.A., Kuehl W.M., Gray N.S., Sabatini D.M. // *Cell.* 2009. V. 137. P. 873–886.
14. Smith E.M., Finn S.G., Tee A.R., Browne G.J., Proud C.G. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 18717–18727.
15. Ballif B.A., Roux P.P., Gerber S.A., MacKeigan J.P., Blenis J., Gygi S.P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. P. 667–672.
16. Manning B.D., Tee A.R., Logsdon M.N., Blenis J., Cantley L.C. // *Mol. Cell.* 2002. V. 10. P. 151–162.
17. Hildebrandt F., Benzing T., Katsanis N. // *N. Engl. J. Med.* 2011. V. 364. P. 1533–1543.
18. Mok C.A., Heon E., Zhen M. // *Clin. Genet.* 2010. V. 77. P. 18–27.
19. Duldulao N.A., Li J., Sun Z. // *Protein Cell.* 2010. V. 1. P. 726–736.
20. Courtney K.D., Corcoran R.B., Engelman J.A. // *J. Clin. Oncol.* 2010. V. 28. P. 1075–1083.

УДК 577.352.332:577.112.083

Бактериальный синтез и очистка трансмембранного сегмента нормальной и мутантной рецепторной тирозинкиназы FGFR3 человека

С. А. Гончарук^{1,2*}, М. В. Гончарук^{1,2}, М. Л. Майзель¹, Д. М. Лесовой¹, В. В. Чупин¹,
Э. В. Бочаров¹, А. С. Арсеньев¹, М. П. Кирпичников^{1,2}

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

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

*E-mail: ms.goncharuk@gmail.com

Поступила в редакцию 17.05.2011 г.

РЕФЕРАТ Рецептор фактора роста фибробластов 3, FGFR3 – белок семейства рецепторных тирозинкиназ, играет важную роль в развитии скелета человека. Мутации в этом белке, в том числе замены Gly380Arg или Ala391Glu в его трансмембранной (ТМ) области, приводят к различным нарушениям развития костной системы. Определение пространственной структуры ТМ-домена нормального белка FGFR3 человека и варианта с мутациями Gly380Arg и Ala391Glu чрезвычайно важно для понимания механизмов, управляющих димеризацией и передачей сигнала рецепторными тирозинкиназами. Описаны эффективная система экспрессии эукариотических генов в бактериях и протокол очистки, позволяющие получать в миллиграммовых количествах ТМ-фрагменты FGFR3 как нормальные, так и с мутациями Gly380Arg и Ala391Glu, а также их ¹⁵N- и [¹⁵N, ¹³C]-меченные производные. Каждый пептид нарабатывается в клетках *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS в виде гибрида с тиоредоксином А. Протокол очистки включает металлохелатную аффинную, катионо- и анионообменную хроматографию, гидролиз гибридного белка легкой цепью энтерокиназы человека. Эффективность встраивания целевых пептидов в мицеллы ДФХ/ДСН и ДФХ/ДФГ подтверждена при помощи спектроскопии ЯМР. Разработанный метод получения нормальных и мутантных ТМ-фрагментов FGFR3 делает возможным проведение их структурных исследований методом гетероядерной спектроскопии ЯМР высокого разрешения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА мембранный белок, FGFR, бактериальная экспрессия, очистка, солиubilизация, спектроскопия ЯМР.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ РТК – рецепторная тирозинкиназа; FGFR – рецептор фактора роста фибробластов; ТМ – трансмембранный (домен мембранного белка); ДФХ – додецилфосфохолин; ДФГ – додецилфосфоглицерин; ДСН – додецилсульфат натрия; ТФЭ – 2,2,2-трифторэтанол.

ВВЕДЕНИЕ

Рецептор фактора роста фибробластов 3 (FGFR3) относится к семейству рецепторных тирозинкиназ (РТК). Этот белок состоит из внеклеточной части с тремя иммуноглобулинподобными доменами, гидрофобного трансмембранного (ТМ) домена и внутриклеточной части с двумя тирозинкиназными доменами. Специфические лиганды (факторы роста фибробластов) и гепарин связываются с иммуноглобулинподобным доменом FGFR3, стабилизируя димерный комплекс из двух молекул рецептора и обеспечивая передачу сигнала внутрь клетки [1, 2]. FGFR3

играет важную роль в процессах роста и развития человека – как эмбрионального и неонатального, так и во взрослом организме. Мутации в этом белке могут приводить к различным нарушениям развития соединительной ткани и скелета [3–5]. Известно также, что FGFR3 участвует в образовании опухолей [5, 6]. В частности, мутации Gly380Arg и Ala391Glu в трансмембранной (ТМ) области FGFR3 вызывают летальную дисплазию [7] и синдром Крузона с акантокератодермией [8] соответственно. При этом мутация Ala391Glu встречается как при нарушениях формирования скелета, так и при онкогенезе [6]. Счи-

тается, что мутации Gly380Arg и Ala391Glu стабилизируют димеризацию FGFR3 в клеточной мембране, приводя к нерегулируемой передаче сигнала и возникновению патологии [9, 10]. Однако детальный механизм функционирования FGFR3 изучен не до конца. В современной структурной биологии наиболее часто используется подход, предполагающий разбиение исследуемого мембранного белка на составляющие и изучение водорастворимых частей молекулы и ее ТМ-участков по отдельности [11–15]. Получение с высоким разрешением структуры нормального ТМ-домена FGFR3 человека и домена с мутациями Gly380Arg и Ala391Glu чрезвычайно важно для понимания механизмов, управляющих их димеризацией и функционированием, поскольку именно эти фрагменты служат связующим звеном между внеклеточным и внутриклеточным доменами РТК и непосредственно участвуют в передаче сигнала внутрь клетки.

В представленной статье описаны эффективная система экспрессии генов и протокол очистки, позволяющие получить препаративные количества ТМ-фрагмента FGFR3 как нормального, так и с одиночными мутациями Gly380Arg и Ala391Glu, а также их ^{15}N - и [^{15}N , ^{13}C]-меченных производных. Разработанный подход получения ТМ-пептидов делает возможным проведение их структурных исследований методом гетероядерной спектроскопии ЯМР высокого разрешения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы штаммы *Escherichia coli* XL-10-Gold («Stratagene», США) и BL21(DE3)pLysS («Stratagene»), плазмиды pGEMEX-1 («Promega», США) и pGEMEX-1/TRX-TMS [16]. Олигонуклеотиды синтезированы фирмой «Evrogen» (Россия). ДНК секвенировали в Межинститутском центре коллективного пользования «ГЕНОМ» (Россия). Для введения изотопных меток ^{15}N , ^{13}C использовали реагенты фирмы «CIL» (США). Полностью дейтерированный додецилфосфоглицерин (ДФГ) получен ферментативной реакцией трансфосфатидилирования из полностью дейтерированных додецилфосфохолина (ДФХ) и глицерина в присутствии фосфолипазы D [17].

Клонирование генов

Плазмидные векторы для экспрессии генов пептидов в виде гибрида с тиоредоксином А конструировали согласно [12, 16–19]. Гены, кодирующие ТМ-фрагменты FGFR3 человека (*tmFGFR3*): аминокислотные остатки 357–399 нормального FGFR3 (*tmFGFR3-nat*) и 357–399 FGFR3 с точечными мутациями G380R (*tmFGFR3-R*) и A391E (*tmFGFR3-E*) собирали из ше-

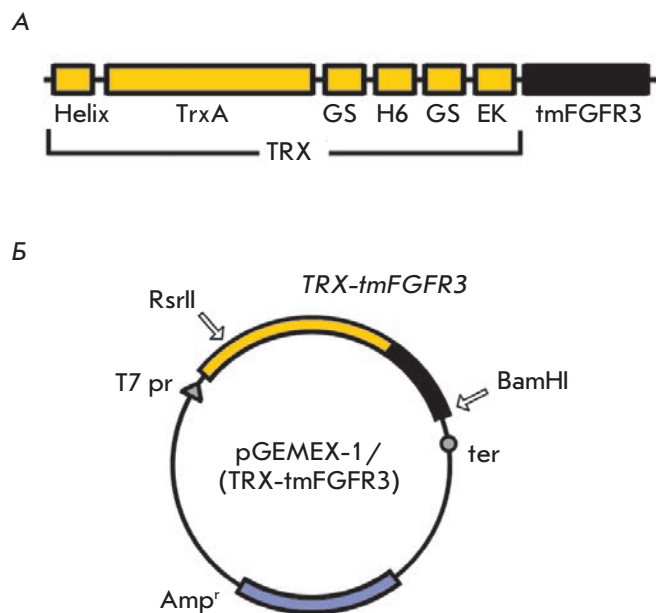


Рис. 1. Схематическое изображение (А) гибридных белков TRX-tmFGFR3 и (Б) соответствующих экспрессионных векторов. Helix – N-концевая аминокислотная последовательность мембраноактивного белка из *Helicobacter pylori*; TrxA – тиоредоксин А *E. coli*; GS – последовательность Gly-Ser-Gly-Ser-Gly; H6 – последовательность из шести His; EK – сайт узнавания легкой цепи энтерокиназы человека; tmFGFR3 – нормальный трансмембранный пептид FGFR3 или пептид с мутациями Gly380Arg или Ala391Glu; Amp^r – ген устойчивости к ампициллину.

сти химически синтезированных олигонуклеотидов с частично перекрывающейся нуклеотидной последовательностью. Используемые кодоны оптимизировали для экспрессии генов в клетках *E. coli*. В 3'-концевые праймеры вводили сайт рестрикции BamHI, в 5'-концевые праймеры – последовательность, кодирующую сайт узнавания энтерокиназы. Эту же последовательность добавляли и на 3'-конец гена белка-носителя (TRX), амплифицированного при помощи ПЦП с вектора pGEMEX-1/(TRX-TMS) [16]. Рекомбинацию генов TRX и *tmFGFR3* проводили при помощи ПЦП с образованием TRX-tmFGFR3. Экспрессионные плазмиды pGEMEX-1/(TRX-tmFGFR3) (рис. 1Б) получали в результате клонирования фрагментов TRX-tmFGFR3, обработанных эндонуклеазами рестрикции RsrII и BamHI, в линеаризованные теми же рестриктазами векторы pGEMEX-1/(TRX-TMS) [16]. Правильность нуклеотидной последовательности в пределах экспрессионных кассет подтверждали при помощи секвенирования ДНК по обеим цепям.

Таблица 1. Состав автоиндукционных сред

Среда	Studier*	Na ₂ HPO ₄ , мМ	KH ₂ PO ₄ , мМ	Бактотриптон	Дрожжевой экстракт, %	Глицерин	Na ₂ SO ₄ , MgSO ₄ , NH ₄ Cl, глюкоза, лактоза, металлы
ВУМ5052	ZYM-5052	+	+	2%	1	+	+
М5052	N-5052	25	25		0.0002	+	+
С750501'	С-750501	+	+		0.0002	+	+
М50501	С-750501	25	25		0.0002	0.5%	+

*Названия автоиндукционных сред Studier [20], взятых за основу.

Примечание. Знаком «+» отмечены вещества, используемая концентрация которых совпадает с концентрацией в средах Studier [20].

Подбор условий культивирования рекомбинантного штамма *E. coli*

Гены гибридных белков экспрессировали в клетках *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Клетки растили на богатых и бедных средах. При этом применяли как химическую индукцию синтеза белка (среды ТВ, М9), так и автоиндукцию [20] (среды ВУМ5052, М5052, С750501' или М50501, табл. 1). При подборе оптимальных условий синтеза белка к культуре клеток, росшей при 28°C и достигшей оптической плотности $OD_{550} \sim 1.5$ о.е. (среда ТВ) или ~ 0.6 о.е. (среда М9), добавляли индуктор, изопропил- β -D-тиогалактозид (ИПТГ), до конечной концентрации 1, 0.25, 0.05, 0.01, 0 мМ и продолжали культивировать в течение 15 ч при 250 об/мин и температуре 37°C; в течение 40 ч (ТВ) или 60 ч (М9) при 25°C; 60 ч (ТВ) или 72 ч (М9) при температуре 13°C. В случае автоиндукционных сред клетки культивировали при 300 об/мин и температуре 18°C в течение 4 дней (ВУМ5052) или 7 дней (М5052, С750501' или М50501). Оптимальную температуру, концентрацию ИПТГ и продолжительность культивирования определяли при помощи Трис-глицинового ДСН-ПААГ-электрофореза.

Экспрессия генов

Для препаративного получения меченых белков использовали среду М9, содержащую 0.0002% дрожжевого экстракта, ¹⁵NH₄Cl и [U-¹³C]-глюкозу (¹⁵N, ¹³C-мечение) или ¹⁵NH₄Cl и небогатенную глюкозу (¹⁵N-мечение). Для продукции целевых гибридных белков в культуру клеток с OD_{600} , равной примерно 0.6 о.е. (среда М9, изотопное мечение) или 1.5 о.е. (среда ТВ, без меток), добавляли ИПТГ до конечной концентрации 0.05 мМ и понижали температуру с 28 до 13°C. Клетки растили при 250 об/мин в течение 72 ч, после чего собирали центрифугированием и хранили при -20°C.

Очистка целевых белков

Биомассу, полученную с 1 л культуры, суспендировали в 50 мл лизирующего буфера (50 мМ Трис, pH 8.0, 150 мМ NaCl, 10 мМ имидазол, 1% Тритон X-100, 0.2 мМ фенилметилсульфонилфторид), разрушали при помощи ультразвука, центрифугировали и фильтровали через мембрану с размером пор 0.22 мкм. Осветленный лизат наносили на колонку с Chelating Sepharose FF («Amersham Bioscience», США), предварительно заряженную Ni²⁺ и уравновешенную буфером А (50 мМ Трис, pH 8.0, 250 мМ NaCl, 1% Тритон X-100), содержащим 10 мМ имидазол. Смолу последовательно промывали буфером А, содержащим 10 мМ имидазол, и этим же буфером, содержащим 40 мМ имидазол. Белок элюировали буфером А, содержащим 175 мМ имидазол. Элюат разбавляли в 11 раз буфером, содержащим 17 мМ Трис, pH 8.0, 20 мМ NaCl и 1% Тритон X-100, и добавляли легкую цепь рекомбинантной энтерокиназы человека [21] в соотношении 25 ед. акт. фермента на 1 мг TRX-tmFGFR3. Смесь инкубировали в течение ночи при комнатной температуре и наносили на колонку с Chelating Sepharose FF, уравновешенную буфером В, pH 8.0 (20 мМ Трис, 40 мМ NaCl, 1% Тритон X-100, 16 мМ имидазол). Фракцию, не связавшуюся со смолой, собирали, pH довели до 4.55 концентрированной уксусной кислотой, фильтровали через мембрану (размер пор 0.22 мкм) и наносили на колонку с SP Sepharose FF («Amersham Bioscience», США), уравновешенную буфером В, pH 4.55. После нанесения смолу промывали этим же буфером. Фракцию, не связавшуюся со смолой, собирали, pH довели до 9.0 при помощи NaOH, фильтровали через мембрану с размером пор 0.22 мкм и наносили на колонку с Q Sepharose FF («Amersham Bioscience», США), уравновешенную буфером С (20 мМ Трис, pH 8.8, 1% Тритон X-100). Пептиды элюировали линейным градиентом NaCl

(0–1 М). После осаждения 10% раствором трихлоруксусной кислоты (ТХУ) очищенные пептиды трижды промывали ацетоном и высушивали под вакуумом. Чистоту и соответствие очищенных пептидов целевым подтверждали методами гель-электрофореза, масс-спектрологии MALDI (оборудование Daltonics Ultraflex II TOF/TOF, «Bruker Daltonik», Германия) и спектрологии ЯМР.

Солубилизация tmFGFR3 в мембраноподобном окружении

Образцы изотопно-меченных tmFGFR3 для предварительного сворачивания в спиральную конформацию растворяли в смеси ТФЭ/Н₂О (60/40) с добавлением 2 мМ трис(2-карбоксииэтил)фосфина (ТСЕР) для предотвращения образования неспецифической межмолекулярной дисульфидной связи. Полного растворения добивались с использованием 10 циклов замораживания (в жидком азоте)/оттаивания. Гомогенизированные образцы получали с помощью ультразвукового воздействия (ультразвуковая ванна D-78224 Singen/Htw («Elma», Германия)) на этапе оттаивания в каждом из 10 циклов. Растворимость и формирование вторичной структуры tmFGFR3 в смеси ТФЭ/Н₂О контролировали с помощью ¹H/¹⁵N-bestHSQC ЯМР-спектров [22–24], анализируя ширину сигналов и их дисперсию. Раствор tmFGFR3 в ТФЭ/Н₂О смешивали с необходимым количеством растворенных в ТФЭ/Н₂О детергентов и/или липидов до соотношения детергент (липид)/пептид от 120 до 40. Полученную смесь лиофилизовали (ModulyoD-230 Freeze Dryer, «Thermo», Канада), затем растворяли в Н₂О/D₂О (10/1) с проведением 10 циклов замораживания/оттаивания (под воздействием ультразвука) для гомогенизации белка и его полного встраивания в детергентные ми-

целлы или липидные бицеллы. Гетероядерные ЯМР-спектры пептидов tmFGFR3, встроенных в супрамолекулярные комплексы, получали при температуре 40°C и варьировании pH от 3.5 до 6.5 на спектрометре AVANCE («Bruker», Германия), оборудованном криогенно охлаждаемым датчиком повышенной чувствительности, с рабочей частотой на протонах 700 МГц.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Система экспрессии генов tmFGFR3

В работе исследовали пептиды, первичная структура которых соответствовала полноразмерному ТМ-фрагменту FGFR3 (tmFGFR3) с прилегающими к гидрофобной области участками: нормальному (tmFGFR3-nat) и с патогенными точечными мутациями G380R (tmFGFR3-R) или A391E (tmFGFR3-E) (табл. 2).

Из-за быстрой протеолитической дегградации небольших пептидов в процессе их экспрессии в клетках бактерий tmFGFR3 получали в виде гибрида с тиоредоксином *A. E. coli* (TrxA) как описано ранее [12] (рис. 1А). Между фрагментами TrxA и tmFGFR3 гибридного белка встраивали шесть остатков гистидина (H6), сайт узнавания легкой цепи энтерокиназы человека (ЕК), а также подвижные глицин-богатые участки, Gly-Ser-Gly-Ser-Gly (GS) с обеих сторон H6. Высокоспецифичный фермент ЕК селективно гидролизует пептидную связь, находящуюся сразу после сайта узнавания (за исключением связи Lys-Pro). На N-конце гибридного белка располагалась аминокислотная последовательность Helix [12], способствующая устранению токсичности некоторых ТМ-пептидов по отношению к клетке-хозяину (данные не приведены). Гены, кодирующие гибридные белки Helix-TrxA-GS-H6-GS-EK-tmFGFR3 (далее

Таблица 2. Эффективность протокола получения гибридных белков (TRX-tmFGFR3) и целевых пептидов (tmFGFR3)

ТМ-пептид	Мол. масса, кДа	Аминокислотная последовательность ТМ-фрагмента	ЕК*, ед./мг	Выход**, мг/л	
				TRX-tmFGFR3	tmFGFR3
tmFGFR3-nat	4.6	L ³⁵⁷ PAEEELVEADEAGSVYAGILSYGVGFFLFILVVAAVTLCLRLR ³⁹⁹	25	40	6
tmFGFR3-R	4.7	L ³⁵⁷ PAEEELVEADEAGSVYAGILSYR ³⁸⁰ VGFFLFILVVAAVTLCLRLR ³⁹⁹	30	20	4
tmFGFR3-E	4.7	L ³⁵⁷ PAEEELVEADEAGSVYAGILSYGVGFFLFILVVE ³⁹¹ AVTLCLRLR ³⁹⁹	30	50	7

*Активность легкой цепи энтерокиназы, требуемая для расщепления 1 мг гибридных белков TRX-tmFGFR3.

**Усредненный выход гибридных белков (TRX-tmFGFR3) и очищенных пептидов (tmFGFR3), включая их ¹⁵N- и [¹⁵N, ¹³C]-меченные производные, из 1 л культуральной среды (M9). Выход оценивали по интенсивности окрашивания (Кумасси голубой) полос после ПААГ-электрофореза, а также по весу высушенных очищенных пептидов tmFGFR3.

Примечание. Выделены аминокислотные участки, предположительно соответствующие ТМ-доменам. Мутации Gly380Arg (tmFGFR3-R) и Ala391Glu (tmFGFR3-E) отмечены жирным шрифтом.

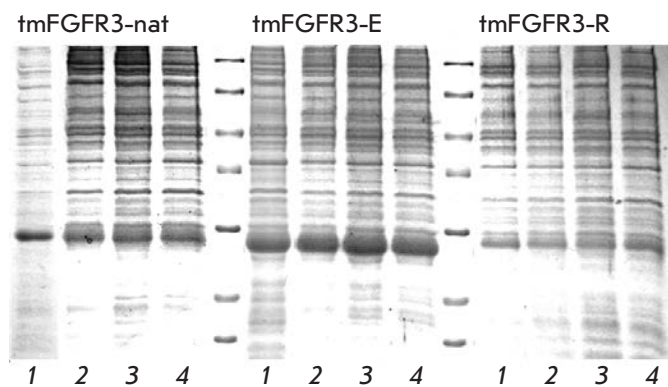


Рис. 2. Накопление целевых гибридных белков TRX-tmFGFR3 в клетках рекомбинантных штаммов, выращенных на минимальной солевой среде М9 и на автоиндукционных средах М5052, С750501' и М50501. Анализ в 14% Трис-глициновом ДСН-ПААГ клеточного лизата TRX-tmFGFR3-nat, TRX-tmFGFR3-E и TRX-tmFGFR3-R. Рекомбинантные штаммы выращены на среде М9, при 13°C после индукции 0.05 мМ ИПТГ (1); на автоиндукционной среде М5052 при 18°C (2); на автоиндукционной среде М50501 при 18°C (3); на автоиндукционной среде С750501' при 18°C (4). В каждую ячейку внесен эквивалент 20 мкл культуры клеток. Маркеры молекулярных масс белков: 116.0, 66.2, 45.0, 35.0, 25.0, 18.4, 14.4 кДа (сверху вниз).

TRX-tmFGFR3), встраивали в плазмидные векторы pGEMEX-1 под транскрипционный контроль T7-промотора с образованием экспрессионных векторов pGEMEX-1/(TRX-tmFGFR3) (рис. 1Б).

Для наработки белков плазмиды переносили в клетки *E. coli* BL21(DE3)pLysS, поскольку в них удается обеспечить приемлемый уровень экспрессии целевых генов. При выборе между автоиндукцией [20] и химической индукцией в пользу первой говорит отсутствие в необходимости добавлять индуктор при достижении культурой клеток определенной оптической плотности. При сравнимых выходах целевых белков индукция при помощи ИПТГ экономически более выгодна, поскольку для меченя изотопом ^{13}C в качестве единственного источника углерода можно использовать $[\text{U}-^{13}\text{C}]$ -глюкозу вместо существенно более дорогого $[\text{U}-^{13}\text{C}]$ -глицерина.

Условия культивирования, при которых наблюдается максимальное накопление целевых белков, определяли, тестируя среды, используемые для индукции синтеза белка при помощи ИПТГ (ТВ и М9), а также автоиндукционные среды, предложенные FW Studier [20], взятые с небольшими модификациями (табл. 1). В среды, предназначенные для получения изотопно-меченных производных пептидов (М5052 – для введения ^{15}N , а М9, С750501' и М50501 – для введения

^{15}N , ^{13}C), добавляли дрожжевой экстракт до концентрации 0.0002%. Опытным путем показано, что такая концентрация дрожжевого экстракта способствует максимальному увеличению выхода целевого белка, не влияя на содержание ^{15}N и ^{13}C в целевом белке. Ввиду высокой стоимости $[\text{U}-^{13}\text{C}]$ -глицерина мы провели ряд экспериментов, направленных на определение оптимальной концентрации глицерина в автоиндукционной среде, при которой наблюдается максимальное накопление целевого продукта. Оказалось, что снижение концентрации глицерина в полтора раза вместе с двукратным понижением концентрации фосфатов в культуральной среде (среда М50501) или не влияет на выход целевого продукта (tmFGFR3-nat и tmFGFR3-R), или увеличивает его накопление (tmFGFR3-E) (рис. 2). Это позволяет существенно снизить затраты на получение ^{15}N , ^{13}C -меченных препаратов при использовании принципа автоиндукции.

Бактериальные клетки, трансформированные соответствующим вектором, выращивали при 18°C в случае автоиндукции; при 37, 25 и 13°C (после добавления ИПТГ) при использовании химической индукции. Понижение температуры культивирования способствует поддержанию белка в растворимой форме [12]. Так, в случае химической индукции при выращивании клеток как на богатой (ТВ), так и на бедной (М9) средах при высокой температуре (37°C), после добавления ИПТГ гибридные белки TRX-tmFGFR3 накапливались преимущественно в составе телец включения. При понижении температуры до 25°C растворимость белка повышалась – около половины его находилось в составе телец включения. При 13°C все гибридные белки обнаруживались преимущественно в растворимой форме (рис 2, 3).

Зависимость уровня экспрессии генов от температуры культивирования, а при химической индукции от концентрации индуктора (1.0, 0.25, 0.05 и 0.01 мМ ИПТГ) оценивали при помощи ДСН-ПААГ-электрофореза. По результатам анализа для наработки немеченых целевых белков использовали богатую среду ТВ (13°C после индукции). Выход гибридных белков при использовании сред М9 и М50501 оказался сравнимым (рис. 2), поэтому для получения изотопно-меченных целевых пептидов в препаративных количествах мы выбрали среду М9 (13°C после индукции). Максимальный выход всех TRX-tmFGFR3 и их ^{15}N - или ^{15}N , ^{13}C -меченных производных достигнут при 0.05 мМ ИПТГ.

Очистка гибридных белков

После лизиса клеток гибридные белки очищали при помощи металлохелатной аффинной хроматографии (МХАХ). Во избежание выпадения целевых

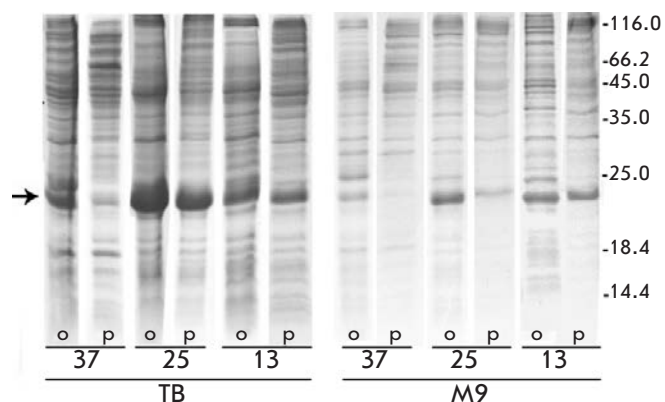


Рис. 3. Накопление гибридного белка TRX-tmFGFR3-E при культивировании клеток на богатой (ТВ) и бедной (М9) средах в зависимости от температуры (37, 25, 13°C) после индукции ИПТГ. Анализ в 14% Трис-глициновом ДСН-ПААГ клеточного лизата TRX-tmFGFR3-E (0.05 мМ ИПТГ). Справа приведены маркеры молекулярных масс белков, кДа. Стрелка указывает на полосы, соответствующие гибриднему белку TRX-tmFGFR3-E. В ячейки вносили по 5 мкл (ТВ) или 10 мкл (М9) культуры клеток. о – суммарный, р – растворимый белок.

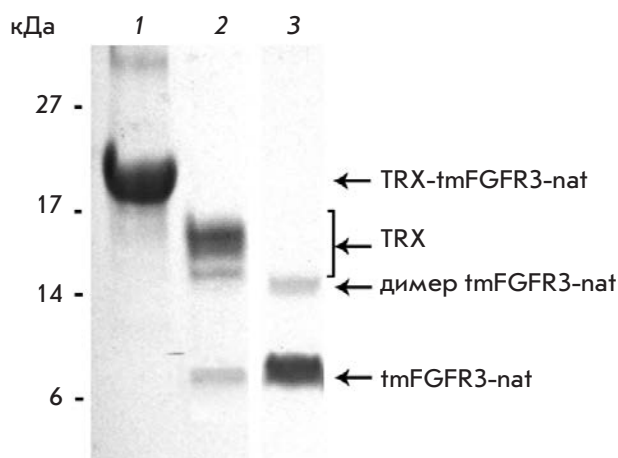


Рис. 4. Эффективности очистки tmFGFR3-nat. 1 – Очищенный гибридный белок, 2 – продукты гидролиза энтерокиназой, 3 – очищенный tmFGFR3-nat. Стрелками отмечены: гибридный белок TRX-tmFGFR3-nat, белок-носитель TRX, димерная и мономерная формы tmFGFR3-nat. Электрофорез в 14% трициновом ДСН-ПААГ. Расчетная молекулярная масса TRX-tmFGFR3-nat – 19.6 кДа, tmFGFR3-nat – 4.6 кДа.

белков в осадок на этой и последующих стадиях очистки использовали неионный детергент Тритон X-100. Чистота белковых препаратов, полученных методом МХАХ, составила не менее 80%. Молекулярные массы гибридных белков, определенные по их электрофоретической подвижности (ДСН-ПААГ, трициновый буфер) (рис. 4), сходны с расчетными значениями.

Гибридные белки TRX-tmFGFR3, очищенные при помощи МХАХ, расщепляли с использованием легкой цепи энтерокиназы человека (ЕК) [21] (рис. 1А). При оптимизации условий реакции для каждого пептида учитывали эффективность последующих стадий очистки. Оптимальный состав реакционной смеси получали, разбавляя фракции, содержащие гибридный белок в 11 раз (см. раздел “Экспериментальная часть”). Для полного отделения пептидов tmFGFR3 от белка-партнера использовали ЕК (30 ед. акт. на 1 мг гибридного белка TRX-tmFGFR3) (рис. 4).

После расщепления гибридного белка в течение ночи для исключения из реакционной смеси фрагментов TRX, а также остаточных количеств гибридных белков, проводили МХАХ. Концентрирование и дополнительная очистка целевых пептидов tmFGFR3 при помощи двух последовательных стадий катионообменной и анионообменной хроматографии при значениях pH, обеспечивающих максимальный заряд и сродство целевых полипептидов к ионообменным

смолам, позволили получить белковые препараты чистотой не менее 97%. Результаты ДСН-ПААГ-электрофореза подтверждают эффективность гидролиза TRX-tmFGFR3-E и очистки tmFGFR3-E (рис. 4). Результаты очистки и эффективность предложенного протокола аналогичны для tmFGFR3-nat и tmFGFR3-R. Электрофоретическая подвижность tmFGFR3 соответствует подвижности пептидов преимущественно в мономерных конформациях. Чистота и соответствие очищенных пептидов целевым tmFGFR3 подтверждены при помощи масс-спектроскопического анализа (рис. 5) и спектроскопии ЯМР.

Как уже отмечалось выше, пептиды tmFGFR3 получали в присутствии Тритона X-100. Высокое оптическое поглощение водного раствора Тритона X-100 препятствует использованию оптических методов анализа и определению посредством спектроскопии КД вторичной структуры пептидов в этом детергенте. В случае спектроскопии ЯМР (см. ниже) даже примесные концентрации Тритона X-100 в образце негативно влияют на свойства мембраноподобного окружения, используемого для структурных исследований, а также на пространственную структуру пептида. Для эффективного удаления детергента из раствора пептиды с Тритоном X-100 осаждали ТХУ с последующим промыванием осадка охлажденным ацетоном [12]. Высокую эффективность удаления Тритона X-100 из белковых образцов под-

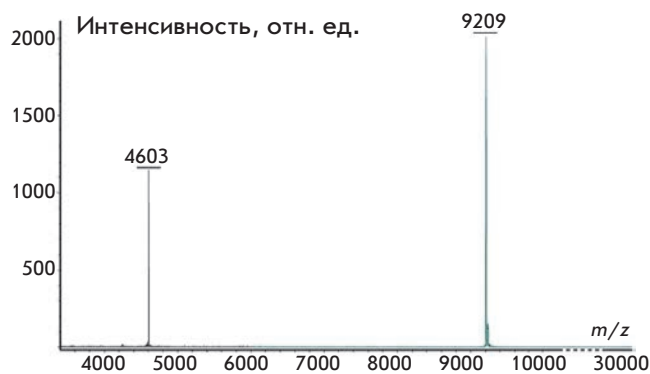


Рис. 5. Масс-спектрометрический анализ очищенного tmFGFR3-nat. Пики на спектре соответствуют мономеру (m/z 4603) и димеру (m/z 9209) tmFGFR3-nat.

тверждали методом спектроскопии ЯМР. С помощью описанной процедуры удалось довести выход целевых белков до 4–8 мг/л культуры. Чистота рекомбинантных белков и степень введения [^{15}N , ^{13}C]-меток были не менее 97%.

Солюбилизация tmFGFR3 в мембраноподобном окружении

Выбор среды, имитирующей окружение объекта в клеточной мембране, исключительно важен для успешного проведения его структурно-функциональных исследований [23]. При этом состав мембраноподобного окружения, оптимальный для ЯМР-исследований, определяется следующими основными параметрами: размером супрамолекулярных частиц со встроенными в них tmFGFR3; монодисперсностью образца; отсутствием агрегации и стабильностью образца; реализацией нативной спиральной конформации и димеризацией tmFGFR3. Соответствие супрамолекулярных комплексов tmFGFR3 в выбранном мембраноподобном окружении этим критериям оценивали при помощи спектроскопии ЯМР. В качестве мембраноподобной среды были испробованы как детергентные мицеллы, так и липидные бицеллы различного состава. Итоговое качество образцов с точки зрения возможности проведения дальнейших структурных исследований методом спектроскопии ЯМР оценивали с использованием двумерных спектров $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -bestHSQC и $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -TROSY. Анализировали общее количество разрешенных кросс-пиков, количество кросс-пиков в области NH-сигналов остатков глицина, дисперсию, уширение и дублирование сигналов.

Стоит отметить, что для структурных исследований мембранных белков и пептидов методами ЯМР в растворе зачастую требуются как цвиттер-ионные,

так и заряженные дейтерированные детергенты, которые дают возможность имитировать частично заряженные клеточные мембраны. К настоящему времени единственным коммерчески доступным полностью дейтерированным отрицательно заряженным детергентом является ДСН. Этот детергент не имеет структурных аналогов среди фосфолипидов, входящих в состав биологических мембран, поэтому использование ДСН для моделирования свойств мембран не всегда корректно. В представленной работе мы попробовали использовать полностью дейтерированный ДФГ, синтезированный нами, для создания частичного отрицательного заряда на поверхности мицелл. Структура полярной «головы» ДФГ такая же, как и у фосфатидилглицерина, основного отрицательно заряженного фосфолипида в составе бактериальных мембран. Использование ДФГ позволяет лучше моделировать свойства биологических мембран по сравнению с ДСН.

Нами подобраны условия солюбилизации tmFGFR3-nat, позволяющие изучать его пространственную структуру и димеризацию. Наилучшие результаты при солюбилизации пептида tmFGFR3-nat получены при использовании смешанных мицелл полностью дейтерированных ДФХ/ДФГ (9/1 моль/моль) и ДФХ/ДСН (9/1 моль/моль). Общее количество пиков, хорошая дисперсия сигналов (существенно превышающая соответствующие значения для пептида в конформации «клубок», что говорит о формировании вторичной структуры) и небольшая ширина линий в спектре $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -bestHSQC полностью соответствуют ожидаемым на основании аминокислотной последовательности пептида, его вторичной структуры и гидродинамического размера (рис. 6). Наличие дублирования кросс-пиков в $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -bestHSQC-спектрах, а также зависимость относительных интенсивностей в этих дублетах от количества молекул tmFGFR3-nat, встроенных в одну мицеллу (рис. 6),

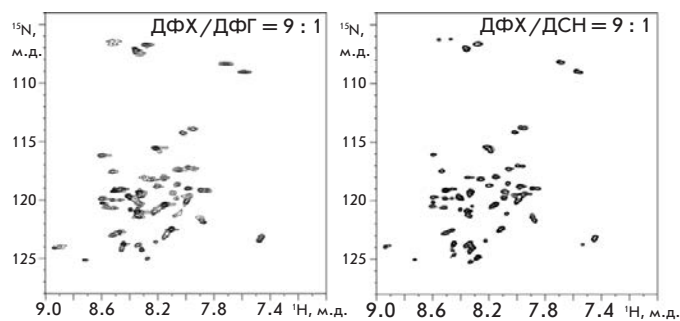


Рис. 6. $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -bestHSQC ЯМР-спектры tmFGFR3-nat в мицеллах ДФХ/ДФГ (слева) и ДФХ/ДСН (справа). Температура 40°C, pH 5.7, соотношение детергент/пептид – 40.

указывают на успешное определение условий димеризации tmFGFR3-nat, подходящих для структурных исследований методом гетероядерной ЯМР-спектроскопии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанная система экспрессии генов и протокол очистки позволяют получать рекомбинантные трансмембранные пептиды tmFGFR3, в том числе изотопно-меченные производные в миллиграммовых количествах, необходимых для проведения структурно-функциональных исследований. Относительно небольшой размер комплексов пептидов в мембраноподобном окружении свидетельствует о возможности получения пространственной структуры tmFGFR3-nat в димерном состоянии при помощи гетероядерной спектроскопии ЯМР высокого разрешения [12, 24]. В настоящее время уже определяется конформация димера tmFGFR3-nat и начато изучение процессов специфической ассоциации tmFGFR3-E и tmFGFR3-R, получение которых опи-

сано в нашей работе. Предложенная технология получения рекомбинантных пептидов позволит лучше понять механизм функционирования и передачи сигнала с участием рецептора FGFR3, а также пролить свет на молекулярные механизмы возникновения различных нарушений развития скелета человека, возникновение которых непосредственно связано с мутациями в ТМ-домене FGFR3. ●

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, Программы Российской академии наук «Молекулярная и клеточная биология» и Федеральных целевых программ «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 годы» (П1276 и 16.740.11.0195), а также Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы» (16.512.11.2172).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Pantoliano M.W., Horlick R.A., Springer B.A., van Dyk D.E., Tobery T., Wetmore D.R., Lear J.D., Nahapetian A.T., Bradley J.D., Sisk W.P. // *Biochemistry*. 1994. V. 33. P. 10229–10248.
- Shi E., Kan M., Xu J., Wang F., Hou J., McKeenan W.L. // *Mol. Cell Biol.* 1993. V. 13. P. 3907–3918.
- Vajo Z., Francomano C.A., Wilkin D.J. // *Endocr. Rev.* 2000. V. 21. P. 23–39.
- Passos-Bueno M.R., Wilcox W.R., Jabs E.W., Sertie A.L., Alonso L.G., Kitoh H. // *Human Mutat.* 1999. V. 14. P. 115–125.
- Cappellen D., de Oliveira C., Ricol D., Diez de Medina S.G., Bourdin J., Sastre-Garau X., Chopin D., Thiery J.P., Radvanyi F. // *Nat. Genet.* 1999. V. 23. P. 18–20.
- van Rhijin B., van Tilborg A., Lurkin I., Bonaventure J., de Vries A., Thiery J.P., van der Kwast T.H., Zwarthoff E.C., Radvanyi F. // *Eur. J. Hum. Genet.* 2002. V. 10. P. 819–824.
- Webster M.K., Donoghue D.J. // *EMBO J.* 1996. V. 15. P. 520–527.
- Meyers G.A., Orlow S.J., Munro I.R., Przylepa K.A., Jabs E.W. // *Nat. Genet.* 1995. V. 11. P. 462–464.
- Merzlyakov M., Chen L., Hristova K. // *J. Membr. Biol.* 2007. V. 215. P. 93–103.
- Li E., You M., Hristova K. // *J. Mol. Biol.* 2006. V. 356. P. 600–612.
- MacKenzie K.R., Prestegard J.H., Engelman D.M. // *Science*. 1997. V. 276. P. 131–133.
- Goncharuk M.V., Schulga A.A., Ermolyuk Ya.S., Tkach E.N., Goncharuk S.A., Pustovalova Yu.E., Mineev K.S., Bocharov E.V., Maslennikov I.V., Arseniev A.S., et al. // *Mol. Biology (Moscow)*. 2011. V. 45. in press.
- Bocharov E.V., Mineev K.S., Volynsky P.E., Ermolyuk Y.S., Tkach E.N., Sobol A.G., Chupin V.V., Kirpichnikov M.P., Efremov R.G., Arseniev A.S. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. P. 6950–6956.
- Mineev K.S., Bocharov E.V., Pustovalova Y.E., Bocharova O.V., Chupin V.V., Arseniev A.S. // *J. Mol. Biol.* 2010. V. 400. P. 231–243.
- Bocharov E.V., Mayzel M.L., Volynsky P.E., Mineev K.S., Tkach E.N., Ermolyuk Y.S., Schulga A.A., Efremov R.G., Arseniev A.S. // *Biophys. J.* 2010. V. 98. P. 881–889.
- Кирпичников М.П., Гончарук М.В., Ермолюк Я.С., Гончарук С.А., Шульга А.А. Маслеников И.В., Арсеньев А.С. // *Технологии живых систем*. 2005. V. 2. P. 20–27.
- Schmitt J.D., Amidon B., Wykle R.L., Waite M. // *Chem. Phys. Lipids*. 1995. V. 77. P. 131–137.
- Bocharov E.V., Mayzel M.L., Volynsky P.E., Goncharuk M.V., Ermolyuk Y.S., Schulga A.A., Artemenko E.O., Efremov R.G., Arseniev A.S. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. P. 29385–29395.
- Bocharov E.V., Pustovalova Y.E., Pavlov K.V., Volynsky P.E., Goncharuk M.V., Ermolyuk Y.S., Karpunin D.V., Schulga A.A., Kirpichnikov M.P., Efremov R.G., et al. // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. P. 16256–16266.
- Studier F.W. // *Protein Expr. Purif.* 2005. V. 41. P. 207–234.
- Gasparian M.E., Ostapchenko V.G., Schulga A.A., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. // *Protein Expr. Purif.* 2003. V. 31. P. 133–139.
- Schanda P., Lescop E., Falge M., Sounier R., Boisbouvier J., Brutscher B. // *J. Biomol. NMR*. 2007. V. 38. P. 47–55.
- Kim H.J., Howell S.C., van Horn W.D., Jeon Y.H., Sanders C.R. // *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 2009. V. 55. P. 335–360.
- Jura N., Endres N.F., Engel K., Deindl S., Das R., Lamers M.H., Wemmer D.E., Zhang X., Kuriyan J. // *Cell*. 2009. V. 137. P. 1293–1307.

УДК 57.083.3; 577.112

Получение рекомбинантного конъюгата пероксидазы хрена с Fab-фрагментом антител с использованием экспрессионной системы *Pichia pastoris*

О. В. Колясников^{1,2#}, В. Г. Григоренко^{2**}, А. М. Егоров², S. Lange³, R. D. Schmid³¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Специализированный учебно-научный центр, кафедра химии, 121357, Москва, ул. Кременчугская, 11²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра химической энзимологии, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3³Institute of Technical Biochemistry, University of Stuttgart, Stuttgart, Allmandring, 31, Germany, 70569

*E-mail: vitaly@immunotek.ru

Вклад авторов в публикацию равноценен.

Поступила в редакцию 05.05.2011 г.

РЕФЕРАТ Рекомбинантные иммуноконъюгаты ферментов-маркеров с антигенами или антителами обладают рядом преимуществ перед конъюгатами, полученными традиционными методами химического синтеза: они гомогенны по составу, имеют строго определенную стехиометрию и сохраняют функциональную активность как белка-маркера, так и антигена/антитела. На основе челночного вектора pPICZαВ нам удалось впервые получить рекомбинантный конъюгат пероксидазы хрена (HRP) с Fab-фрагментом антитела против атразина. Получена генетическая конструкция, которая позволяет изменять последовательность антительной части путем реклонирования переменных частей. Возможно также изменение ферментной части. Иммуноконъюгаты успешно экспрессированы в системе метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris*. Наличие у иммуноконъюгатов активности – как ферментативной, так и антигенсвязывающей – подтверждено методом ИФА.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА пероксидаза хрена, антитела, рекомбинантные конъюгаты, экспрессия в системе *P. pastoris*.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ HRP – пероксидаза хрена; ИФА – иммуноферментный анализ; БСА – бычий сывороточный альбумин; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ТМВ – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин; АБТС – 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолино-6-сульфоная кислота).

ВВЕДЕНИЕ

Разработка методов ИФА связана с необходимостью получения конъюгатов ферментов-маркеров, таких, как пероксидаза хрена (HRP, [КФ 1.11.1.7]), с антигенами или антителами, в которых антиген или антитело сохраняет иммунологическую активность и не происходит инактивации фермента. Однако все основные подходы, используемые для химического конъюгирования белков и гаптен, приводят к частичной инактивации ферментов и гетерогенности конъюгатов, что влияет на специфичность и чувствительность иммуноферментного анализа. Методами генной инженерии можно получать рекомбинантные конъюгаты белков с антигенами или антителами. Такие конъюгаты имеют ряд преимуществ – они гомогенны

по составу, имеют стехиометрию 1 : 1 и сохраняют функциональную активность как белка-маркера, так и антигена/антитела, а также воспроизводимость и относительную простоту получения. Рекомбинантные конъюгаты антител со щелочной фосфатазой [1–3], люциферазой [4] и пероксидазой *Arthromyces ramosus* [5] получены ранее.

Рекомбинантный конъюгат HRP с белком-переносчиком жирных кислот (FABP) [6], полученный нами ранее, экспрессировали в клетках *Escherichia coli* и использовали в качестве иммуотрейсера при проведении иммуноферментного анализа с целью ранней диагностики инфаркта миокарда.

Функциональная экспрессия рекомбинантного конъюгата HRP и фрагментов антител в *E. coli* сопря-

жена с рядом трудностей, поскольку в клетках *E. coli* отсутствует посттрансляционное гликозилирование белков, что приводит к низкой растворимости и агрегации получаемого белка. Эта проблема может быть решена сменой экспрессионной системы. Например, показано, что метилотрофные дрожжи *Pichia pastoris* более подходят для экспрессии антител, чем клетки *E. coli* [7, 8].

HRP [9] и фрагменты антител [10] – как в одноцепочечной форме scFv [11, 12], так и в форме Fab [13] – успешно экспрессировали в клетках *P. pastoris* по отдельности. Более того, с использованием этой экспрессионной системы созданы некоторые иммуноконъюгаты [14–16]. Показано также, что экспрессия генов в системе *P. pastoris* в секретлируемой форме существенно упрощает масштабирование процесса для биотехнологических приложений [17].

Недавний прогресс в функциональной экспрессии HRP и антител в секретлируемой форме открывает путь к созданию рекомбинантных конъюгатов HRP с антителами для использования в иммуноанализе. С целью изучения возможностей такого подхода мы впервые получили рекомбинантные конъюгаты HRP с Fab-фрагментами антител против атразина. В этих химерных белках пероксидазная часть объединена с N- и C-концевой частью тяжелой цепи антитела через короткую гибкую линкерную последовательность. Получены универсальные векторы для экспрессии конъюгатов HRP и переменных цепей Fab-фрагментов антител (простая замена переменных частей тяжелой и легкой цепи любого другого антитела с помощью реклонирования по сайтам PstI/BstEII и BamHI/XhoI соответственно) в секретлируемой форме в клетках *P. pastoris*. Получен функционально активный конъюгат HRP с Fab (атразин), обладающий антигенсвязывающими свойствами, аналогичными свойствам моноклональных антител, что подтверждено методом одностадийного конкурентного иммуноанализа атразина ($IC_{50} \sim 3$ нг/мл).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты

Реагенты были приобретены у компаний «Sigma», «Fluka», «Difco» и использовались без дальнейшей очистки. Белковый электрофорез (SDS-PAGE) проводили по стандартной методике с использованием набора белков с низкой молекулярной массой (LMW, «Bio-Rad»). Препаративную работу с ДНК проводили с использованием наборов QIA prep Spin Miniprep Kit и QIAquick Gel extraction Kit («Qiagen», Германия). Использовали ферменты рестрикции и модификации ДНК фирм «New England Biolabs», «Boehringer-Mannheim», «GIBCO-BRL-Life technologies», «MBI».

Олигонуклеотиды для секвенирования и ПЦР заказывали в фирмах «ARK Scientific», «MWG Biotech» или «Interactiva» (Германия).

Обработка и представление результатов

Генно-инженерную часть работы планировали с помощью программы CloneManager (Scientific & Educational Software, Cary, США). Пространственные структуры иммуноконъюгатов были смоделированы и визуализированы в пакете программ InsightII («BioSym Inc.», США) на рабочей станции SGI R4400. Экспериментальные данные подготовлены к публикации с использованием программ, входящих в пакет OpenOffice.org (www.openoffice.org), а также GIMP (GNU Image Manipulation Program).

Микроорганизмы, среды, плазмиды и олигонуклеотиды

Штамм DH5 α *E. coli* использовали для генетических манипуляций, для промежуточной продукции белка – *E. coli* BL21(DE3) pLysS («Novagen»). Клетки культивировали в среде LB (1% экстракт дрожжей, 1% пептон, 0,5% NaCl), дополненной 25 мг/л зеоцина («Invitrogen»).

Получение компетентных клеток. Клетки *E. coli* растили в течение ночи до OD_{600} 0,4–0,6 в 50 мл среды LB и отделяли от культуральной среды центрифугированием (3500 об/мин, 4°C) в течение 10 мин. Осадок клеток ресуспендировали в буфере TSS (буфер на основе среды LBS, содержащий в 100 мл 10 г ПЭГ-6000, 5 мл DMSO и 0,6 г $MgCl_2$; pH 6,5), выдерживали в течение 1 ч на льду, расфасовывали на аликвоты по 200 мкл и быстро замораживали при $-80^\circ C$.

Рекомбинантные антитела и их конъюгаты с HRP экспрессировали с использованием *P. pastoris* X33 («Invitrogen») и челночного вектора pPICZ α B («Invitrogen») для клонирования. Сайт NotI мы удаляли с использованием прямых и обратных праймеров (таблица). Для встраивания гена HRP за геном тяжелой цепи антитела и удаления сайтов рестрикции BspCI, ApaI, PstI, BstEII, BglII, XhoI, BamHI, SacI и PvuI использовали метод трехстадийной ПЦР с применением праймеров, также перечисленных в таблице.

Модификация ДНК и трансформация клеток

Для работы с ДНК использовали стандартные процедуры [18]. Клетки *E. coli* трансформировали, добавляя плазмиды или лигазную смесь к размороженным компетентным клеткам. Клетки *P. pastoris* трансформировали плазмидами, предварительно линеаризованными по сайту PmeI, методом электропорации.

Культивирование *P. pastoris* и секрция рекомбинантного конъюгата

Клетки *P. pastoris* наращивали в среде YPD (1% экстракт дрожжей, 2% пептон, 2% D-глюкоза). Целевой белок синтезировали в среде YP без глюкозы с использованием в качестве индуктора 0.5 об.% метанол. При трансформации клеток *P. pastoris* использовали среду YPDS (YPD, содержащая 1 М сорбита). Твердая среда содержала 1.5% бактоагара. Трансформанты выращивали в среде YPDS при 30°C и перемешивании (200 об/мин) до $OD_{600} = 15$ ед. Клетки центрифугировали при 3000 g и 4°C, промывали средой YP и доводили OD_{600} до 1. Индукцию проводили в течение 96 ч, добавляя 0.5 об.% метанола каждые 24 ч. Супернатант концентрировали ультрафильтрацией на мембране («Amicon», 10 кДа).

Синтез конъюгата бычьего сывороточного альбумина (БСА) с атразином

Смесь 1 мг производного атразина (4-хлор-6-(изопропиламино)-1,3,5-триазин-2-(6-аминокапроновой кислоты)) (~ 3.2 мкмоль), 1.7 мг N-гидроксисукцинимиды (~15 мкмоль), 6.6 мг N,N'-дициклогексилкарбодиимида (~ 30 мкмоль) в 130 мкл 1,4-диоксана перемешивали в течение 8 ч при комнатной температуре. Осадок отделяли центрифугированием на настольной центрифуге (12 000 об/мин, 30 с). Супернатант по каплям добавляли к раствору БСА (2 мг) в 3 мл 0.13 М $NaHCO_3$. Реакционную смесь оставляли в темном месте на 3 ч. Продукт реакции наносили на колонку PD-10, предварительно уравновешенную фосфатно-солевой буферной смесью (PBS), pH 7.5. Собраны и проанализированы спектрофотометрически (при 220 и 260 нм) 16 фракций объемом по 0.5 мл. Фракции с наибольшим отношением $OD_{220/260}$ объединяли и использовали в дальнейших опытах.

Определение активности рекомбинантного конъюгата методом иммуноферментного анализа

ИФА проводили с использованием планшетов («NUNC» MAXI-SORP) с предварительно сорбированным конъюгатом БСА-атразин (разведение 1 : 100) или БСА (10 мкг/мл) в 10 мМ карбонатном буфере, pH 9.0, при 4°C в течение ночи. Образцы супернатанта культуральной среды *P. pastoris* последовательно разводили в PBS, добавляли в лунки планшета и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Далее планшет промывали 3 раза PBS, содержащим 0.1% Твин-20 (PBS-T), добавляли по 50 мкл субстратной смеси ТМВ (0.6 мг/мл ТМВ и 8 мМ H_2O_2 в 0.1 М ацетатном буфере, pH 5). Реакцию останавливали, добавляя 50 мкл 2 М H_2SO_4 , оптическую плотность измеряли при 450 нм.

Конкурентный ИФА для определения атразина

150 мкл калибровочной пробы (0.1, 1.0, 10, 20, 50, 100, 500 нг/мл атразина в PBS-T) и 40 мкл раствора рекомбинантного конъюгата вносили в лунки планшета с предварительно сорбированным конъюгатом БСА-атразин и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Планшет промывали 3 раза PBS-T и добавляли по 50 мкл субстратной смеси ТМВ. Реакцию останавливали, добавляя 50 мкл 2 М H_2SO_4 , оптическую плотность измеряли при 450 нм.

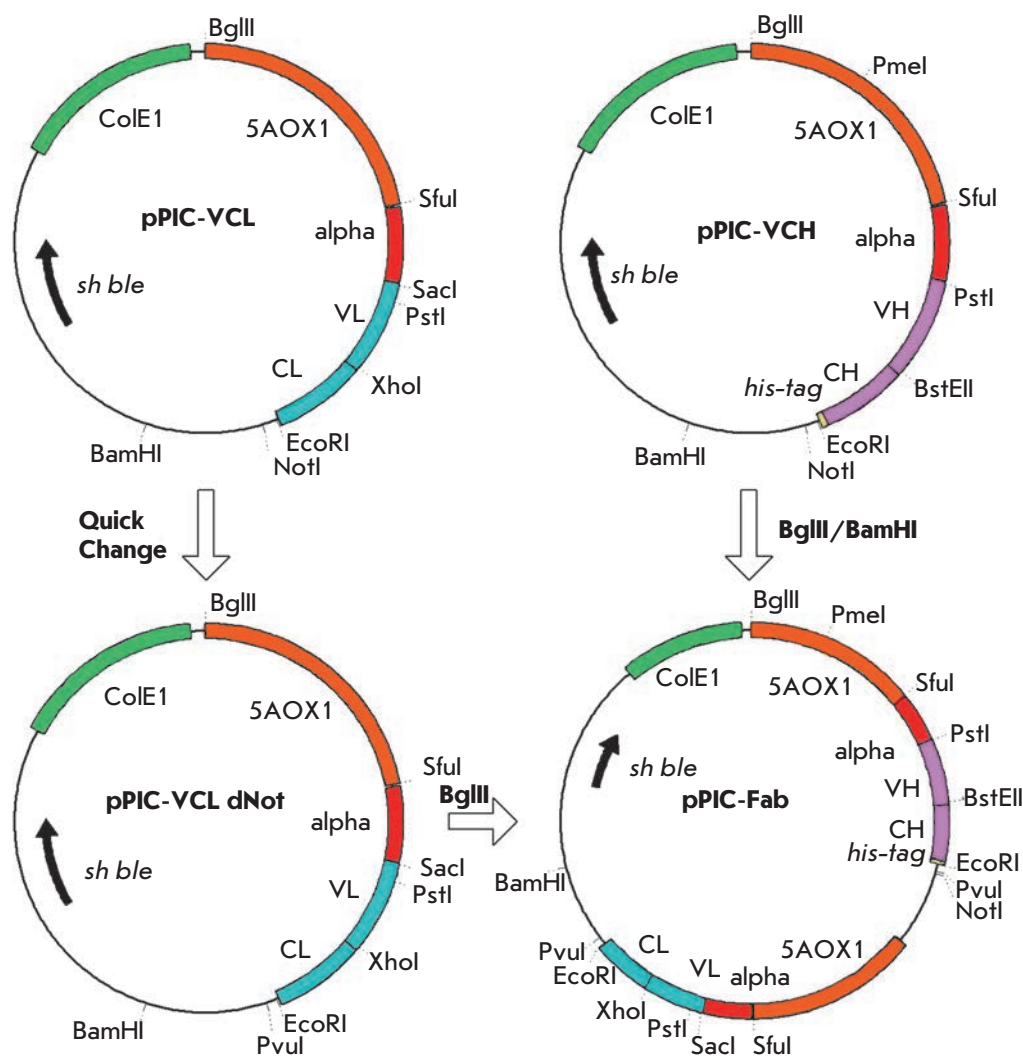
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Рекомбинантные конъюгаты – это химерные белки, в которых объединены структурные части как фермента-маркера, так и антигена/антитела. Использование современных подходов практически решило проблему получения таких рекомбинантных ферментов, как щелочная фосфатаза, β -галактозидаза, люцифераза, пероксидаза хрена, использующихся в качестве маркеров в методах ИФА. Однако получение рекомбинантных конъюгатов – задача довольно сложная, поскольку на сегодняшний день невозможно достоверно предсказать структуру получаемого конъюгата, поэтому возможна потеря функциональной активности как фермента-маркера, так и антигена из-за неправильного фолдинга двух составных частей химерного белка.

Ранее были получены рекомбинантные конъюгаты, в состав которых входят бактериальные ферменты – β -галактозидаза и щелочная фосфатаза, легко экспрессируемые в растворимой форме в клетках *E. coli*, а также некоторые другие ферменты. Основная проблема, связанная с использованием β -галактозидазы и щелочной фосфатазы в составе конъюгатов, – их тетрамерная и димерная структуры соответственно, что приводит к существенному увеличению аффинности конъюгата по сравнению со свободным антителом. Это особенно нежелательно при разработке конкурентных схем ИФА. В то же время пероксидаза хрена, один из наиболее широко применяемых в ИФА ферментов-маркеров, экспрессируется в клетках *E. coli* только в форме телец включения, что до недавнего времени затрудняло получение активного фермента.

Достигнутые за последние годы успехи в гетерологической экспрессии генов антител в клетках метилотрофных дрожжей *P. pastoris* открывают перспективы использования этой системы для синтеза конъюгатов пероксидазы хрена с антителами в секретируемой растворимой и функционально активной форме.

Рис. 1. Схема получения плазмиды pPIC-Fab.



Дизайн экспрессионного вектора для получения рекомбинантного конъюгата HRP с Fab-фрагментом антител в *P. pastoris*

Экспрессионная система для получения рекомбинантных конъюгатов HRP и Fab-фрагментов антител была разработана на основе вектора pPICZαB. Генетическую конструкцию поместили под контроль промотора AOX, содержащего сайт PmeI, для последующей линейаризации и рекомбинации в геном дрожжей. Вектор также содержит сигнальную последовательность α-фактора, необходимую для направленной секреции рекомбинантного белка в культуральную среду. Ген *sh ble* обеспечивает устойчивость к зеоцину как клеток *E. coli*, так и *P. pastoris*. Предусмотрена возможность введения гексагистидиновой последовательности на С-конце рекомбинантного белка для упрощения выделения и очистки продукта.

В качестве исходного материала были использованы ранее полученные плазмиды pPIC-VCL и pPIC-

VCH [19], содержащие соответствующие фрагменты переменных участков легкой и тяжелой цепей моноклонального антитела К4Е7 против атразина [20] соответственно (рис. 1). Оба эти вектора содержали сайт NotI после клонированного гена.

Для создания универсальной конструкции мы планировали оставить в векторе только один сайт NotI после гена тяжелой цепи антитела. Мы удалили сайт NotI из плазмиды pPIC-VCL с помощью ПЦР в формате QuickChange [21] с использованием специальной пары праймеров (таблица). Полученный таким способом вектор назвали pPIC-VCL dNot. Затем фрагмент BglII/BamHI плазмиды pPIC-VCH, содержащий ген тяжелой цепи, клонировали по сайту BglII плазмиды pPIC-VCL dNot перед геном легкой цепи. Таким образом получили экспрессионный вектор pPIC-Fab. Схема клонирования приведена на рис. 1.

Полученный универсальный вектор pPIC-Fab содержит пары сайтов SacI/XhoI и PstI/BstEII для про-

Прямые (F) и обратные (R) праймеры, использованные для создания генетических конструкций методом ПЦР

Ген	Удаляемый сайт рестрикции		Праймер*
<i>HRP</i>	NotI	R	5' -CGATCGAGCC GCG AT GGCCG CCAGC-3'
<i>HRP</i>	NotI	F	5' -GCTGGCGGCC AT CGCGGCTC GATCG-3'
<i>Fab VCH</i>		R	5' -AGGCACAGCT ATAGGTACG-3'
<i>Fab VCH</i>		F	5' -TGAGAACCTC CACCGCCGCA GTCGCGCGGT ACG-3'
<i>HRP</i>		R	5' -GCGGCGGTGG AGGTTCTCAG TTAACGCCGA CTTTCTACG-3'
<i>HRP</i>	PstI, BspCI	R	5' -G A CCGCATGA AGGCTGC T GT CG-3'
«-«	PstI, BspCI	F	5' -AC A GCAGCCT TCATGCG G TC G-3'
«-«	BstEII, ApaI	R	5' -AC T CTAGCCG GCGG T CCCTC-3'
«-«	BstEII, ApaI	F	5' -GG A CCGCCGG CTAG A GTGAC-3'
«-«	XhoI	R	5' -GA A CCG T TCG AGTGATCTAG-3'
«-«	XhoI	F	5' -AGATCACTCG A ACGGTTCAG-3'
«-«	SacI	R	5' -GATCAGGAGC T GTCTCATC-3'
«-«	SacI	F	5' -AA C AGCTCCT GATCAGATTG-3'
<i>Fab VCL</i>	NotI	R	5' -ATCGGTACCT CGATCGAGCC GCG AT GG-3'
<i>Fab VCL</i>	NotI	F	5' -TGAAGTGGTA CGGCGATGC-3'

*Выделены измененные участки нуклеотидной последовательности.

стого клонирования генов тяжелой и легкой цепи, кодирует С-концевой гексагистиридиновый фрагмент для упрощения очистки целевого белка металлохелатной хроматографией, а также сайт NotI для клонирования белка-маркера (такого, как HRP, зеленого флуоресцентного белка (EGFP), люциферазы и др.) на С-конце тяжелой цепи антитела.

Параллельно создан вектор для экспрессии рекомбинантного конъюгата пероксидазы с Fab-фрагментами антител. Для удобства клонирования из исходного гена *HRP* [22], предварительно клонированного в соответствующем векторе рPIC, мы удалили сайты рестрикции PstI, BstEII, BglII, XhoI, SacI, PvuI, ApaI, BamHI и BspCI с использованием ранее перечисленных праймеров (таблица). Одновременно перед геном *HRP* или после него клонировали фрагменты генов антител. Таким образом с помощью трехстадийной ПЦР получены две генетические конструкции, в которых ген *HRP* был соединен короткой гибкой линкерной последовательностью (Gly₄Ser)₃ с последовательностью, кодирующей N-концевую область варибельной части тяжелой цепи Fab или С-концевую область константной части тяжелой цепи (рис. 2). Следует отметить, что тяжелая цепь была выбрана для клонирования гена маркерного белка, чтобы избежать образования нефункциональных димеров легкой цепи. Генетические конструкции клонировали в векторе рPIC-Fab по сайтам PmeI/BstEII и BstEII/NotI соответственно. Взаимное расположение генов в плаزمиде рPIC-Ab-

HRP и рPIC-HRP-Ab подтверждено рестрикционным анализом и секвенированием.

Экспрессия и очистка рекомбинантных конъюгатов Fab-HRP и HRP-Fab

Клетки *P. pastoris* X33 трансформировали плазмидными векторами рPIC-Ab-HRP и рPIC-HRP-Ab методом электропорации с эффективностью около 100 клонов на 10 мкг плазмидной ДНК. Экспрессию целевого белка отслеживали по увеличению пероксидазной активности в супернатанте культуральной среды с выходом на плато на 5-й день культивирования. Проанализировано по 10 клонов с каждой конструкцией. Активность HRP в отношении субстрата ТМБ отмечена только у трех клонов из 20 – двух (1.1, 1.2), соответствующих рPIC-Ab-HRP, и одного (8), соответствующего рPIC-HRP-Ab, – эти клоны были отобраны для дальнейшего рассмотрения.

Как показано с помощью SDS-PAGE-электрофореза (данные не представлены) рекомбинантным конъюгатам HRP-VCH и VCH-HRP соответствуют размытые полосы, расположенные ниже полосы 100 кДа. Эта размытость полос связана с микрогетерогенностью конъюгатов, обусловленной избыточным гликозилированием, характерным для *P. pastoris*, что коррелирует с нашими и опубликованными данными об экспрессии гена *HRP* [9]. Мы наблюдали также существенно больший избыток молекул легкой цепи (полоса в районе 25 кДа), чем при экспрессии Fab-фрагмента [19].

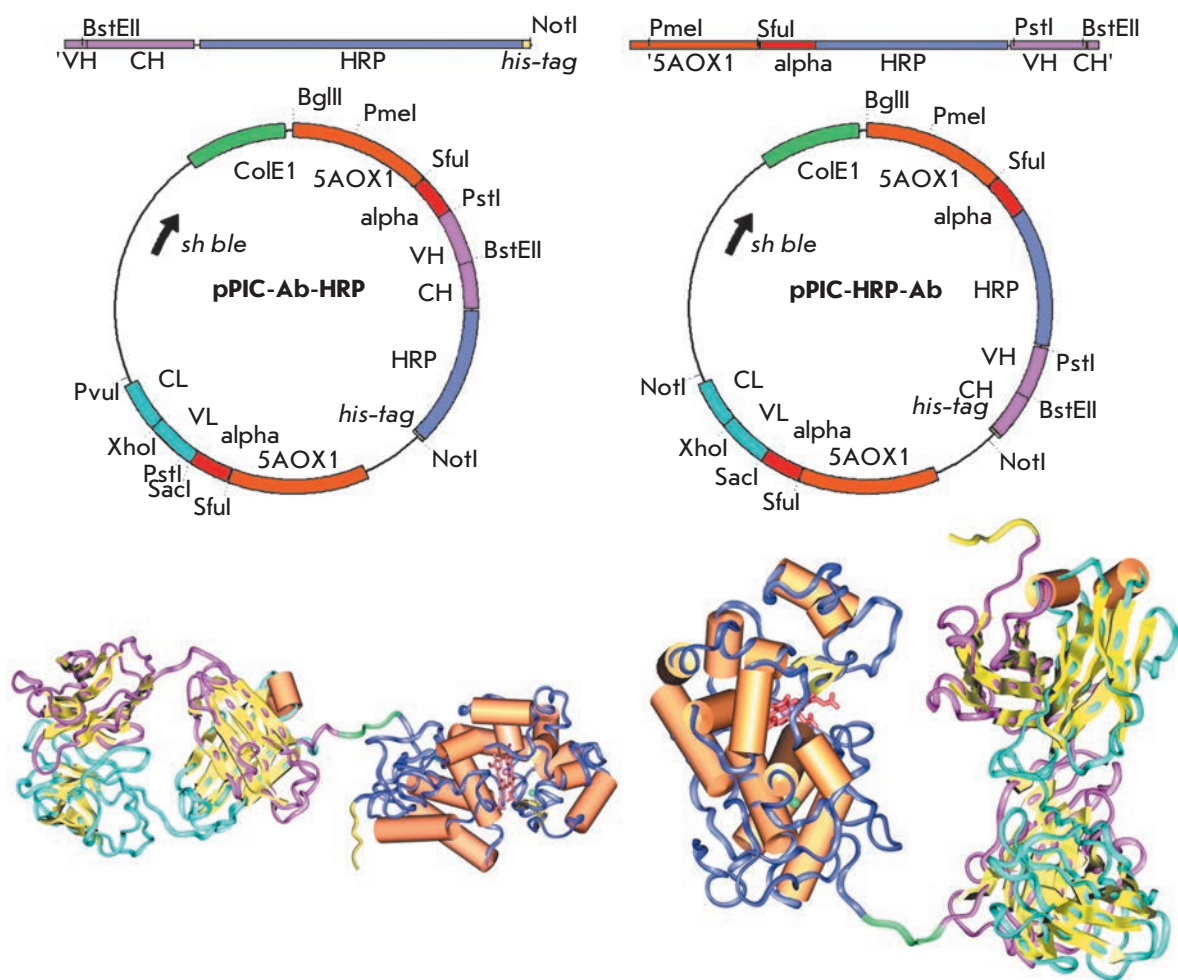


Рис. 2. Схемы клонирования гена *HRP* в плазмидный вектор pPIC-Fab. Пространственные модели рекомбинантных конъюгатов Fab-HRP и HRP-Fab приведены на левой и правой панели соответственно.

Неожиданным оказалось, что рекомбинантные конъюгаты не проявляли ферментативной активности по отношению к другому субстрату пероксидазы – АБТС, в отличие от ТМВ. Известно, что сайт связывания АБТС находится в гидрофобной области на поверхности HRP – в так называемой зоне «Phe patch» [23]. Эта область заметно удалена от активного центра HRP, и можно предположить, что связывание субстрата с ней затруднено по стерическим причинам – вследствие избыточного гликозилирования либо присутствия Fab-фрагмента антитела. Более вероятно первое предположение, так как тот же эффект наблюдается при обоих положениях тяжелой цепи антитела относительно HRP. Более того, сходный эффект мы наблюдали ранее при экспрессии гена *HRP* в *P. pastoris* (данные не опубликованы).

Общий выход рекомбинантных конъюгатов составил около 3–10 мг на 1 л культурального супернатанта *P. pastoris*. Относительно низкий выход секретируемых конъюгатов коррелирует с выходом при экспрессии одного гена *HRP*. Мы полагаем, что один из факторов, негативно влияющих на выход

секретируемого продукта – избыточное гликозилирование пероксидазной части конъюгата, характерное для клеток *P. pastoris*. Для проверки этой гипотезы целесообразным может быть удаление всех сайтов N-гликозилирования в HRP либо замена HRP репортерным белком, например EGFP.

Характеристика рекомбинантных конъюгатов методом ИФА

Для подтверждения антигенсвязывающей активности рекомбинантных конъюгатов мы выбрали схему непрямого конкурентного одностадийного ИФА (рис. 3), проводимого на планшетах с иммобилизованным конъюгатом атразина с БСА. Предварительно было изучено связывание рекомбинантных конъюгатов с атразином (рис. 4). Полученные данные подтверждают наличие как каталитической, так и антительной активности у всех трех вариантов. Однако низкая активность у образца HRP-Fab (клон 8) в сравнении с С-концевым конъюгатом Fab-HRP (клоны 1.1 и 1.2) может свидетельствовать о том, что взаимное пространственное расположение двух

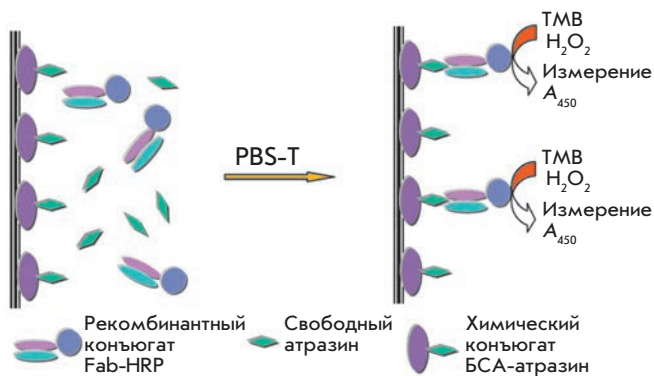


Рис. 3. Схема ИФА для определения атразина.

составных частей химерного белка в этом случае приводит к снижению каталитической активности пероксидазы. Образцы рекомбинантных конъюгатов Fab-HRP (клоны 1.1 и 1.2) обладают сходными характеристиками, и в дальнейшем для определения атразина методом ИФА использовали образец 1.1. Типичный градуировочный график (рис. 5) позволяет определять концентрацию атразина в широком диапазоне – от 0.1 до 50 нг/мл, коэффициент вариации не превышает 8%. IC_{50} составляет 3 нг/мл, что хорошо согласуется с результатами определения атразина в двухстадийном ИФА с использованием рекомбинантных Fab-фрагментов того же антитела K411B [19], а также с данными по одноцепочечному мини-антителу (scFv), полученному ранее в *E. coli* [24]. В то же время у исходного моноклонального антитела значение IC_{50} составило 0.2 нг/мл [19]. Как и в большинстве подобных случаев, отличие на порядок величины IC_{50} от рекомбинантных антител, вероятнее всего, связано с бивалентностью исходного моноклонального антитела.

Таким образом, полученные в настоящей работе рекомбинантные конъюгаты пероксидазы с Fab-фрагментами антитела против атразина обладают функциональной активностью и могут использоваться для определения атразина методом ИФА.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые показана возможность получения рекомбинантного функционально-активного конъюгата HRP в качестве фермента-маркера с Fab-фрагментами антитела против атразина. В представленной работе получены рекомбинантные конъюгаты, в которых Fab-фрагмент антитела соединен как с N-, так и с C-концом фермента-маркера. Оба эти варианта обладают иммунологической и каталитической активностью.

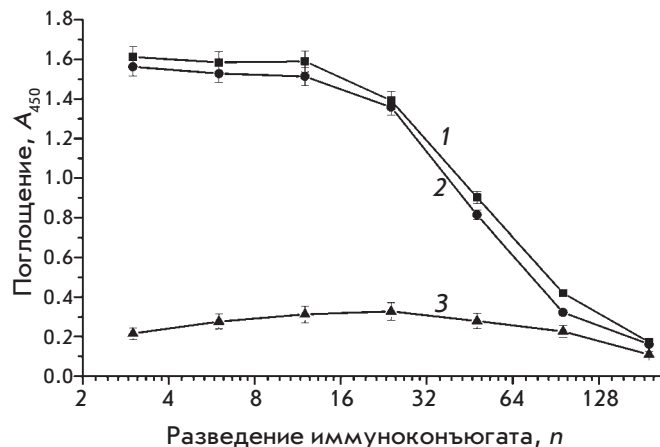


Рис. 4. Титрование рекомбинантных конъюгатов: 1 – клон Fab-HRP 1.1; 2 – клон Fab-HRP 1.2; 3 – клон HRP-Fab 8.

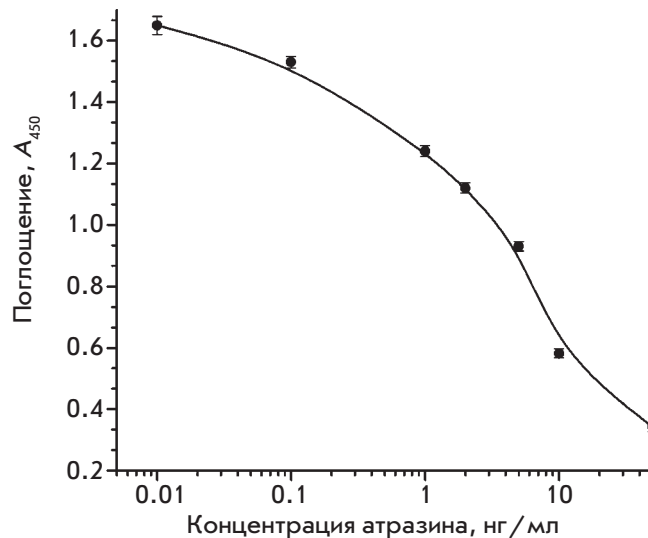


Рис. 5. Градуировочная кривая для определения атразина методом ИФА с использованием рекомбинантного конъюгата (клон Fab-HRP 1.1).

Функциональная секреция рекомбинантных конъюгатов HRP с Fab-фрагментами антител открывает путь к их широкому применению в ИФА. Полученные нами результаты могут быть использованы для разработки высокочувствительных иммунобиосенсоров нового поколения, основанных на технологии рекомбинантных ДНК. ●

Исследование частично финансировалось Германским федеральным министерством науки и технологии (BMBF, грант № 0311574).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rau D., Kramer K., Hock B. // *J. Immunoassay Immunochem.* 2002. V. 23. № 2. P. 129–143.
2. Tachibana H., Takekoshi M., Cheng X.J., Nakata Y., Takeuchi T., Ihara S. // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2004. V. 11. № 1. P. 216–218.
3. Mousli M., Turki I., Kharmachi H., Saadi M., Dellagi K. // *J. Virol. Meth.* 2007. V. 146. №1–2. P. 246–256.
4. Patel K.G., Ng P.P., Kuo C.C., Levy S., Levy R., Swartz J.R. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009. V. 390. № 3. P. 971–976.
5. Joosten V., Roelofs M.S., van den Dries N., Goosen T., Verrips C.T., van den Hondel C.A., Lokman B.C. // *J. Biotechnol.* 2005. V. 120. № 4. P. 347–359.
6. Grigorenko V., Andreeva I., Borchers T., Spener F., Egorov A. // *Anal. Chem.* 2001. V. 73. № 6. P. 1134–1139.
7. Robin S., Petrov K., Dintinger T., Kujumdzieva A., Tellier C., Dion M. // *Mol. Immunol.* 2003. V. 39. № 12. P. 729–738.
8. Cupit P.M., Whyte J.A., Porter A.J., Browne M.J., Holmes S.D., Harris W.J., Cunningham C. // *Lett. Appl. Microbiol.* 1999. V. 29. № 5. P. 273–277.
9. Morawski B., Lin Z., Cirino P., Joo H., Bandara G., Arnold F.H. // *Protein Eng.* 2000. V. 13. № 5. P. 377–384.
10. Pennell C.A., Eldin P. // *Res. Immunol.* 1998. V. 149. № 6. P. 599–603.
11. Fischer R., Drossard J., Emans N., Commandeur U., Hellwig S. // *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1999. V. 30. Pt 2. P. 117–112.
12. Freyre F.M., Vazquez J.E., Ayala M., Canaan-Haden L., Bell H., Rodriguez I., Gonzalez A., Cintado A., Gavilondo J.V. // *J. Biotechnol.* 2000. V. 76. № 2–3. P. 157–163.
13. Takahashi K., Yuuki T., Takai T., Ra C., Okumura K., Yokota T., Okumura Y. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2000. V. 64. № 10. P. 2138–2144.
14. Andrade E.V., Albuquerque F.C., Moraes L.M., Brigido M.M., Santos-Silva M.A. // *J. Biochem. (Tokyo).* 2000. V. 128. № 6. P. 891–895.
15. Luo D., Geng M., Schultes B., Ma J., Xu D.Z., Hamza N., Qi W., Noujaim A.A., Madiyalakan R. // *J. Biotechnol.* 1998. V. 65. № 2–3. P. 225–228.
16. Powers D.B., Amersdorfer P., Poul M., Nielsen U.B., Shalaby M.R., Adams G.P., Weiner L.M., Marks J.D. // *J. Immunol. Meth.* 2001. V. 251. № 1–2. P. 123–135.
17. Hellwig S., Emde F., Raven N.P., Henke M., van der Logt P., Fischer R. // *Biotechnol. Bioeng.* 2001. V. 74. № 4. P. 344–352.
18. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, N.Y.; Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989.
19. Lange S., Schmitt J., Schmid R.D. // *J. Immunol. Meth.* 2001. V. 255. P. 103–114.
20. Giersch T. // *J. Agric. Food Chem.* 1993. V. 41. № 6. P. 1006–1011.
21. Braman J., Papworth C., Greener A. // *Methods Mol. Biol.* 1996. V. 57. P. 31–44.
22. Grigorenko V., Chubar T., Kapeliuch Yu., Borchers T., Spener F., Egorov A. // *Biocatal. Biotransform.* 1999. V. 17. P. 359–397.
23. Ferrari R.P., Traversa S., de Gioia L., Fantucci P., Suriano G., Ghibaudi E.M. // *J. Biol. Inorg. Chem.* 1999. V. 4. № 1. P. 12–20.
24. Kramer K., Hock B. // *Food Agric. Immunol.* 1996. V. 8. P. 97–109.

УДК 57.086.8

Исследование распределения и механических свойств цитоскелета астроцитов в среде культивирования методом атомно-силовой микроскопии

Ю. М. Ефремов^{1*}, Е. В. Дзюбенко^{1,2}, Д. В. Багров¹, Г. В. Максимов¹, С. И. Шрам²,
К. В. Шайтан¹

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

²Учреждение Российской академии наук Институт молекулярной генетики РАН, 123182, Москва, пл. Академика Курчатова, 2

*E-mail: yu.efremov@gmail.com

Поступила в редакцию 23.05.2011 г.

РЕФЕРАТ Изучение морфологии и структуры цитоскелета астроцитов представляет огромный интерес в связи с их участием в развитии различных нейродегенеративных заболеваний. В представленной работе морфологию астроцитов анализировали с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) на близкой к условиям организма системе – органотипической культуре спинномозговых ганглиев (СМГ) эмбриона курицы. Показана возможность визуализации цитоскелета астроцитов, выращенных на желатиновой подложке, непосредственно в среде культивирования. Наблюдаемые с помощью АСМ структуры цитоскелета соответствуют актиновым филаментам и сети микротрубочек, что подтверждается конфокальной микроскопией при иммунофлуоресцентном окрашивании на α -тубулин и фибриллярный актин. Проведено картирование модуля Юнга живого астроцита, при этом более высокие значения модуля Юнга соответствуют местонахождению фибрилл цитоскелета. Применение АСМ позволит изучить динамические изменения структуры и упругих свойств цитоскелета культивируемых астроцитов, представляющие особый интерес при моделировании нейродегенеративных заболеваний с использованием клеточных культур.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА атомно-силовая микроскопия, спинномозговые ганглии, силовая спектроскопия, конфокальная микроскопия, цитоскелет.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АСМ – атомно-силовая микроскопия; СМГ – спинномозговой ганглий; ГФКБ – глиальный фибриллярный кислый белок.

ВВЕДЕНИЕ

Астроциты – один из основных типов клеток в центральной нервной системе, где они выполняют несколько функций: направляют и стимулируют миграцию нейронов в ходе развития, поддерживают микроокружение нейронов, модулируют иммунный ответ за счет презентации антигенов [1]. Исследование морфологии астроцитов представляет огромный интерес в связи с их важной ролью в патогенезе ряда распространенных заболеваний центральной и периферической нервных систем, таких, как ишемический инфаркт мозга, болезнь Альцгеймера, СПИД-ассоциированные деменции [2], диабетическая ретинопатия [3] и др. Для появления названных патологий необходимы серьезные морфологические и физиологические перестройки в клетках нервной системы, изменения в экспрессии генов [2,

4]. Как правило, при этом изменяется и строение цитоскелета [5].

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) уже продолжительное время успешно используется в биологических исследованиях для визуализации биомолекул [6, 7], клеток [8–10] и измерения их механических характеристик [11, 12]. Метод АСМ позволяет одновременно получать трехмерное изображение живой клетки в среде роста и проводить с ней физические микро- и наноманипуляции. На изображениях клеток, полученных в контактном режиме, часто можно наблюдать цитоскелет [9, 13]. Измерение модуля Юнга также позволяет получать важную информацию о физиологическом и функциональном состоянии клеток [14, 15]. В нашей работе использовали прямой метод анализа морфологии астроцитов с помощью АСМ на близкой к условиям организма си-

стеме – органотипической культуре спинномозговых ганглиев (СМГ) эмбриона курицы. Показана возможность изучения цитоскелета астроцитов и измерения локального модуля Юнга клеток в культуре, выявлено влияние цитоскелета на локальный модуль Юнга. Данные о структуре цитоскелета, полученные методом АСМ, сопоставлены с данными конфокальной микроскопии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культура клеток

Органотипическую культуру СМГ эмбриона курицы получали по стандартной методике, описанной, например, в [16]. Вначале дно 35-мм чашки Петри покрывали желатином. Для этого в стерильные чашки наливали по 2 мл 0.5% раствора желатина и инкубировали в течение 1 ч в термостате при 37°C, затем раствор сливали. В результате на дне чашки формировался тонкий слой желатина. Из 11–12-дневного куриного эмбриона с помощью двух скальпелей под биноклем выделяли дорсальные ганглии, затем помещали их в подготовленные чашки, подсушивали и добавляли 2 мл среды культивирования. Использовали жидкую минимальную среду F12 («Биолот», Россия) с пируватом, глутамином, пенициллином, стрептомицином и 10% сыворотки крови лошади.

Для улучшения адгезии клеток и продления времени жизни первичной культуры добавляли фактор роста нервов (NGF 7s) до конечной концентрации 5 нг/мл. Получаемые таким образом препараты представляют собой смешанную первичную культуру нейронов и астроцитов. Эти два типа клеток различаются морфологически – веретенообразная форма и наличие отростков позволяют легко отличить нейрон от звездообразного астроцита [1]. Для идентификации астроцитов проводили иммуноцитохимическое окрашивание на глиальный фибриллярный кислый белок (ГФКБ) (маркерный белок астроцитов) по методике, аналогичной [17].

Атомно-силовая микроскопия

Эксперименты по атомно-силовой микроскопии проводили на АСМ Solver BIO Olympus (ЗАО «Нанотехнология МДТ», Россия) с полем сканирования 100 x 100 x 7 мкм³ и системой емкостных датчиков. Как правило, морфология, присущая живым клеткам, сохраняется в течение нескольких часов. АСМ-исследования проводили только на клетках с такой морфологией. Сканируемую область выбирали с помощью оптического микроскопа, совмещенного с АСМ. Измерения проводили в среде культивирования в контактном и полуконтактном режимах

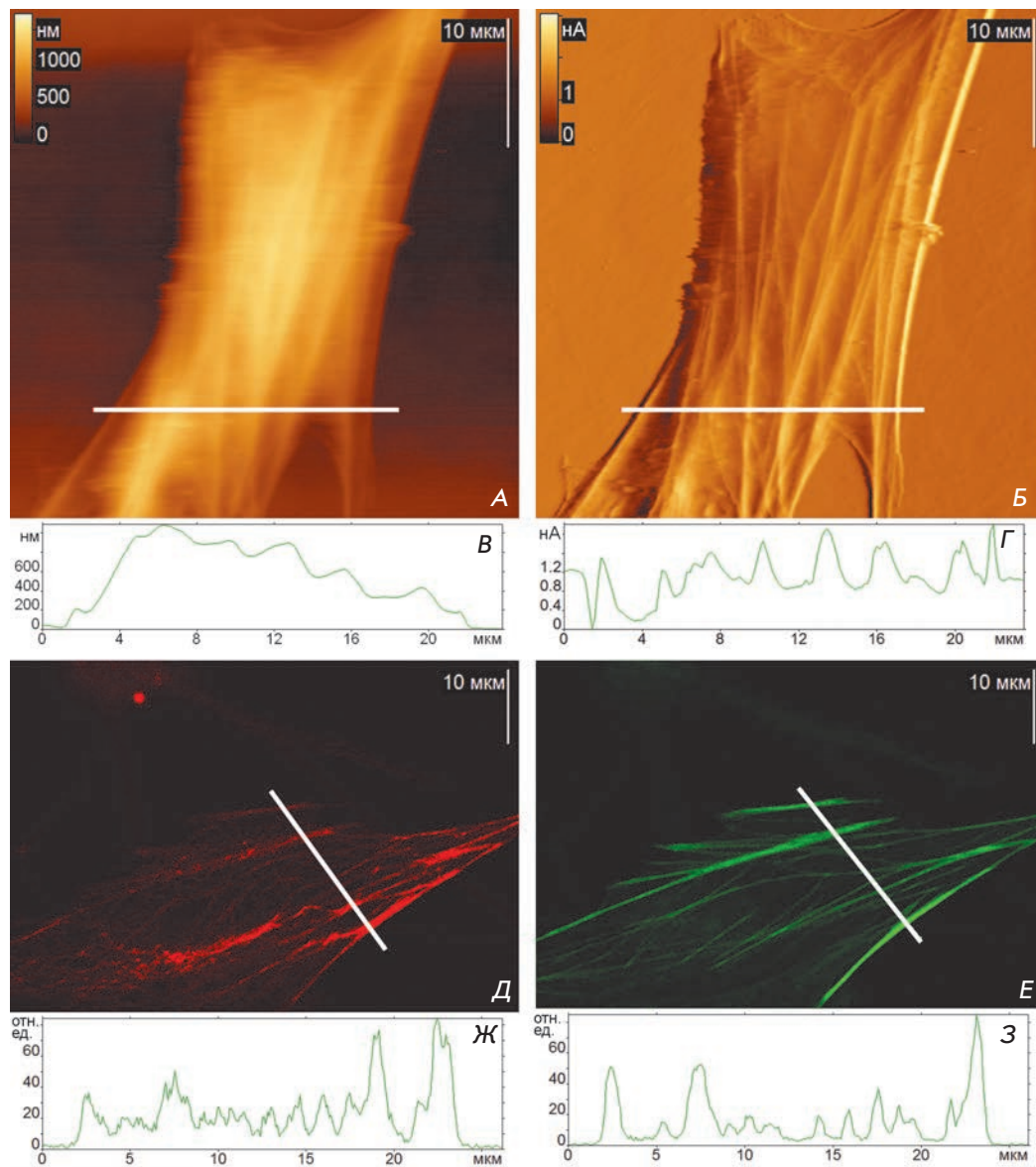
(полуконтактный режим не улучшал качество и информативность изображений, терялась информация о цитоскелете, поэтому приведены только изображения, полученные в контактном режиме) с использованием кантилеверов Veeco MSCT-AUHW («Veeco Instruments», США) из нитрида кремния. В контактном режиме одновременно записывали топографию в двух проходах кантилевера (прямой и обратный) и сигнал ошибки обратной связи. Силу воздействия на образец, измеренную по кривым сила–расстояние, по возможности выбирали минимальной (обычно она составляла 1–4 нН) [18]. Сопоставление сечений, полученных на прямом и обратном проходах, служило критерием правильности настройки обратной связи и корректности получаемых данных. После подбора оптимальных параметров сечения хорошо совпадали, что говорит об отсутствии существенных искажений структуры под действием кантилевера. Сигнал ошибки обратной связи помогает лучше выявить мелкие неоднородности рельефа поверхности [19]. Изображения обрабатывали с использованием программ ImageAnalysis (ЗАО «Нанотехнология МДТ», Россия) и FemtoScan Online (ЗАО «Центр перспективных технологий», Россия).

В ходе экспериментов по силовой спектроскопии с помощью АСМ снимали силовые кривые – графики зависимости силы упругости, действующей на кантилевер со стороны образца, от вертикального смещения сканера [20, 21]. В ходе снятия силовой кривой кантилевер в выбранной точке опускается вниз, продавливая образец на некоторую глубину (при этом получают кривую подвода), до достижения установленной пороговой силы (2–3 нН), затем происходит его поднятие (получают кривую отвода). Для спектроскопии использовали прямоугольные кантилеверы PNP-DB («NanoWorld», Швейцария) и треугольные Veeco MSCT-AUHW («Veeco Instruments», США) из нитрида кремния. Перед проведением спектроскопии жесткость прямоугольных кантилеверов определяли по методу Садера [22, 23], для треугольных использовали значения жесткости, указанные производителем. Калибровку отклонения выполняли по силовой кривой, полученной над поверхностью чистой чашки Петри. Модуль Юнга рассчитывали по кривым подвода с использованием программы EF3 и ImageAnalysis (ЗАО «Нанотехнология МДТ», Россия), в которых реализована расчетная модель Герца в модификации Снеддона [9, 24].

Конфокальная микроскопия и флуоресцентное окрашивание

Препараты фиксировали и иммуноцитохимически окрашивали антителами на α -тубулин (DM1 α , «Santa Cruz Biotechnology», США) с последующим

Рис. 1. Визуализация цитоскелета астроцита с помощью АСМ и конфокальной микроскопии. Представлены типичные изображения. А – Топографическое изображение живого астроцита в жидкости. Б – Соответствующее изображение сигнала ошибки обратной связи. В – Профиль высоты астроцита, измеренный с помощью АСМ вдоль белой линии на топографическом изображении. Г – Профиль сигнала ошибки обратной связи вдоль той же линии. Д – Иммуноцитохимическое окрашивание на α -тубулин микротрубочек (DM1 α + Alexa 594). Е – Окрашивание актиновых филаментов флуоресцентно меченым фаллоидином. Ж, З – Профили интенсивности флуоресценции, измеренные вдоль белых линий на соответствующих флуоресцентных изображениях.



присоединением вторичных антител – конъюгатов с Alexa 594 (Alexa594 anti-mouse polyclone, «Invitrogen», США). Аналогичным образом проводили окрашивание на маркер астроцитов ГФКБ: после инкубации с первичными антителами (GFAP, «Abcam», Англия) добавляли вторичные – конъюгаты с Alexa 546 (Alexa546 anti-rabbit polyclone, «Invitrogen», США). При окрашивании на актин использовали флуоресцентный конъюгат родамин-фаллоидин. Фиксацию и окрашивание проводили согласно [17].

Эксперименты по сканирующей конфокальной микроскопии проводили на микроскопе LSM 510 META («Carl Zeiss», Германия). Распределение актина анализировали с использованием масляного иммерсионного объектива Plan-Apochromat 100x «Carl Zeiss» (апертура 1.4), длины волны возбуж-

дения 514 нм, спектрального диапазона детекции 530–600 нм, конфокальной диафрагмы диаметром 164 μm . Размер изображений – 1024 \times 1024 пикселей (85 нм/пиксель).

Распределение тубулина изучали с использованием масляного иммерсионного объектива Plan-Apochromat 100x «Carl Zeiss» (апертура 1.4), длины волны возбуждения 543 нм, спектрального диапазона детекции 615–700 нм, конфокальной диафрагмы диаметром 184 μm . Размер изображений – 1024 \times 1024 пикселей (85 нм/пиксель).

Распределение ГФКБ анализировали при помощи масляного иммерсионного объектива 63x «Carl Zeiss» (апертура 1.4), длины волны возбуждения 514 нм, спектрального диапазона детекции 530–600 нм, конфокальной диафрагмы диаметром 124 μm . Размер

изображений – 1024 × 1024 пикселей (127 нм/пиксель).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Визуализация цитоскелета астроцита с помощью конфокальной и атомно-силовой микроскопии

Изучение живых клеток на АСМ представляет собой технически и методически сложное направление, поскольку живые клетки – очень мягкие объекты, которые деформируются под действием силы со стороны кантилевера, а также требуют особых условий для поддержания жизнеспособности и должны быть прочно связаны с подложкой [10]. Тщательный выбор способа приготовления образца и параметров сканирования – необходимое условие получения качественных результатов.

Для сканирования на АСМ были выбраны хорошо адгезированные клетки, культивируемые в течение 10 дней. На полученных в контактном режиме топографических изображениях живых астроцитов можно видеть (рис. 1А), что клетки имеют неровную поверхность с протяженными (фибриллярными) структурами. При использовании контактного режима кантилевер проминает мембрану, делая видимыми элементы подмембранного цитоскелета. Наиболее четко они видны при записи сигнала ошибки обратной связи (рис. 1Б), который в каждой точке определяется отклонением кантилевера от положения равновесия. В полуконтактном режиме эти элементы не различимы из-за слабого воздействия со стороны кантилевера. Подобный результат получен в работах [8, 25].

Наиболее выраженными и жесткими структурами внутри клетки являются сети актиновых филаментов и микротрубочек [26]. Мы предполагаем, что при сканировании в контактном режиме живых астроцитов в жидкости удастся визуализировать структуру одной или обеих сетей.

Для подтверждения этого предположения мы сравнили изображения, полученные с помощью АСМ, с изображениями, полученными методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии при иммуофлуоресцентном окрашивании на α -тубулин и F-актин аналогичного астроцита (рис. 1Д,Е). Актиновый цитоскелет клетки, видимый при окрашивании на фибриллярный актин, организован в длинные параллельные фибриллы (рис. 1Е). Окрашивание на α -тубулин (рис. 1Д) отражает распределение микротрубочек в астроците, формирующих сложноорганизованную сеть. Схожую сеть мы видим и на АСМ-изображении микрорельефа живого астроцита (рис. 1А,Б).

Промежуточные филаменты, представленные в астроците ГФКБ, в данной культуре не формиру-

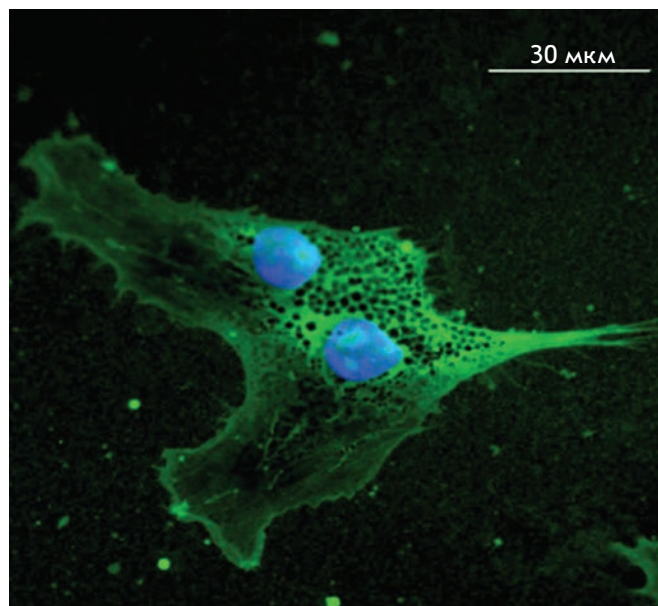


Рис. 2. Иммуоцитохимическое окрашивание на ГФКБ астроцитов органотипической культуры СМГ эмбрионов курицы. Зеленый цвет – Anti-GFAP + Alexa 546, синий – ядра, окрашенные DAPI.

ют регулярных фибриллярных структур либо разрушаются при фиксации (рис. 2). Из сопоставления имеющихся изображений и на основании опубликованных данных [13, 27] мы делаем вывод, что, в отличие от актина и микротрубочек, промежуточные филаменты в данном случае не визуализируются методом АСМ.

Были измерены профили интенсивности флуоресценции вдоль линий, выбранных на изображениях с конфокального микроскопа (рис. 1Ж,З). При расчете профиля происходит усреднение сигнала от нескольких линий, соседствующих с выбранной. Таким образом, наличие четко выделяемых пиков на приведенных профилях отражает присутствие протяженных структур внутри клетки – фибрилл. Поскольку схожие фибриллярные структуры обнаружены во всех трех случаях (рис. 1А,Д,Е), то на основе полученных данных нельзя сказать, какие элементы цитоскелета были нами выявлены при сканировании астроцита в контактном режиме АСМ – микротрубочки или актиновые филаменты. Возможно, обе системы вносят вклад в формирование микрорельефа поверхности (рис. 1А), однако некоторые исследователи [13, 27] считают определяющей роль именно актинового цитоскелета.

Следует также отметить, что ни на одном из измеренных профилей ширина пика не соответствует диаметрам индивидуальной микротрубочки или актинового филамента. Как известно [5], микротрубочки представляют собой протяженные сополимеры

α - и β -тубулина диаметром 10 нм, а актиновые филаменты имеют диаметр 7–8 нм. Следовательно, видимые структуры представляют собой пучки собранных вместе компонентов цитоскелета. Несмотря на трудность четкого разграничения различных сетей цитоскелета, его визуализация с помощью АСМ выгодно отличается от иммуноцитохимического окрашивания тем, что измерения проводятся на живых клетках в среде культивирования.

Таким образом, выращенные на желатиновой подложке астроциты органотипической культуры спинномозговых ганглиев эмбрионов курицы хорошо адгезируются, не сдвигаются в процессе сканирования и обладают высокой жизнеспособностью. Желатиновая подложка может эффективно заменить более дорогостоящие и сложные в приготовлении подложки из полиорнитина с ламинином, коллагена и др. [28].

Силовая спектроскопия и измерение локальных значений модуля Юнга живых астроцитов

С целью получения более полной информации о цитоскелете использовали силовую спектроскопию и измерение локальных значений модуля Юнга живых астроцитов. Силовые кривые снимали в точках, расположенных вдоль выбранных линий (10 или 20 точек на линию) или по сетке (от 4×4 до 7×7 точек). Чтобы показать, что выбранный метод расчета модуля Юнга корректен, измерения проводили двумя кантилеверами (их жесткости отличались на порядок и составляли $k_1 = 0.02$ Н/м и $k_2 = 0.18$ Н/м). Каждым кантилевером измеряли значения модуля Юнга двух-трех клеток. Получены хорошо совпадающие гистограммы (рис. 3) и средние значения модуля Юнга $E_1 = 2.2 \pm 1.6$ кПа и $E_2 = 2.1 \pm 1.6$ кПа, что доказывает корректность проведенных измерений.

Определенный нами на живых астроцитах диапазон значений модуля Юнга имеет большой разброс (0.36–9.6 кПа), что характерно для эукариотических клеток. Известно, что значения модуля Юнга у различных эукариотических клеток лежат в интервале от 0.02 до 400 кПа [14], в том числе у астроцитов из головного мозга крысы – от 1 до 40 кПа [13]. Известно также, что среднее значение модуля упругости нейронов диссоциированной культуры СМГ, адгезированной на полиорнитине/ламинионе [29], составляет 60 кПа. Это согласуется с данными [11, 30], согласно которым астроциты менее жесткие, чем нейроны.

Было проведено картирование модуля Юнга, для чего силовые кривые снимали в точках, расположенных в узлах сетки (рис. 4). На карте со значениями модуля Юнга более светлые квадраты соответствуют значениям с большей жесткостью, темные – с меньшей (рис. 4Б). Также приведен вид силовых кривых в разных точках (рис. 4В,Г,Д). Над подложкой кривая имеет резкий наклон, над краем клетки – плавный изгиб, пока кантилевер не упирается в подложку, над ядром – просто плавный изгиб, и над фибриллами цитоскелета – более резкий изгиб. При снятии силовых кривых вдоль линии было отмечено, что их вид и значения получаемого модуля Юнга зависят от наличия или отсутствия цитоскелета под мембраной в точке снятия. При наличии элементов цитоскелета, которые видны на топографических изображениях, рассчитанные значения модуля Юнга имеют большую величину (рис. 5), что подтверждает данные [13]. Необходимо отметить, что при снятии силовых кривых получается значение модуля Юнга, усредненное по величине контактной площадки между иглой кантилевера и поверхностью клетки. Величина контактной площадки зависит от геометрии зонда и глубины

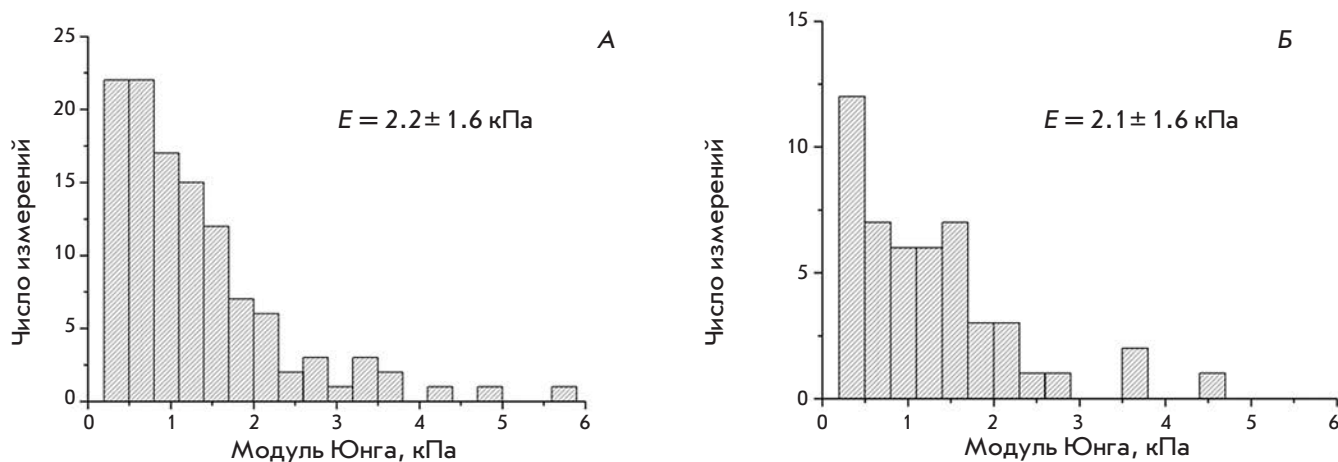


Рис. 3. Диаграммы для значений модуля Юнга астроцитов, полученные длинным кантилевером PNP-DB, $k = 0.02$ Н/м (А) и коротким кантилевером PNP-DB, $k = 0.179$ Н/м (Б).

Рис. 4. Картирование модуля Юнга астроцита. **А** – Изображение живого астроцита (сигнал ошибки обратной связи) и сетка, в точках которой снимались силовые кривые. **Б** – Карта значений модуля Юнга в точках сетки, значения цветовой шкалы в кПа. Более светлые квадраты соответствуют большим значениям жесткости. **В** – Силовая кривая, снятая в точке над краем клетки, часть кривой совпадает с кривой над подложкой. **Г** – Силовая кривая, снятая в точке над ядром клетки. **Д** – Силовая кривая, снятая в точке над подложкой. Зелеными стрелками отмечены точки контакта с поверхностью клетки, синей – точка упора в подложку. Диапазон смещения сканера на всех кривых составлял 2 мкм.

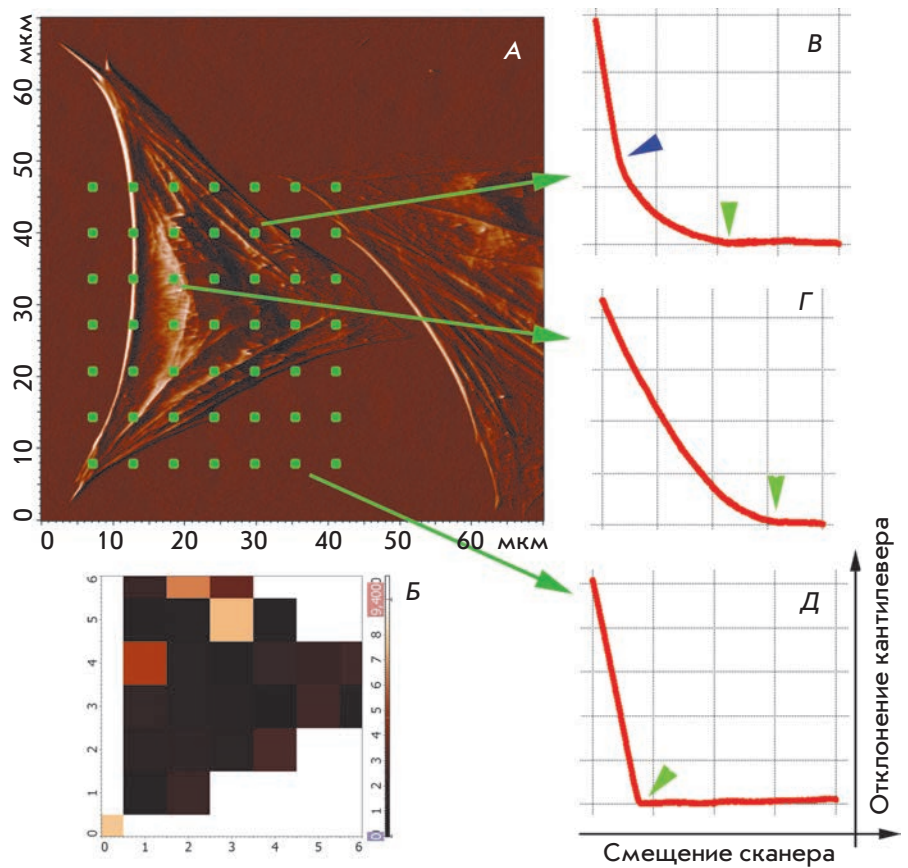
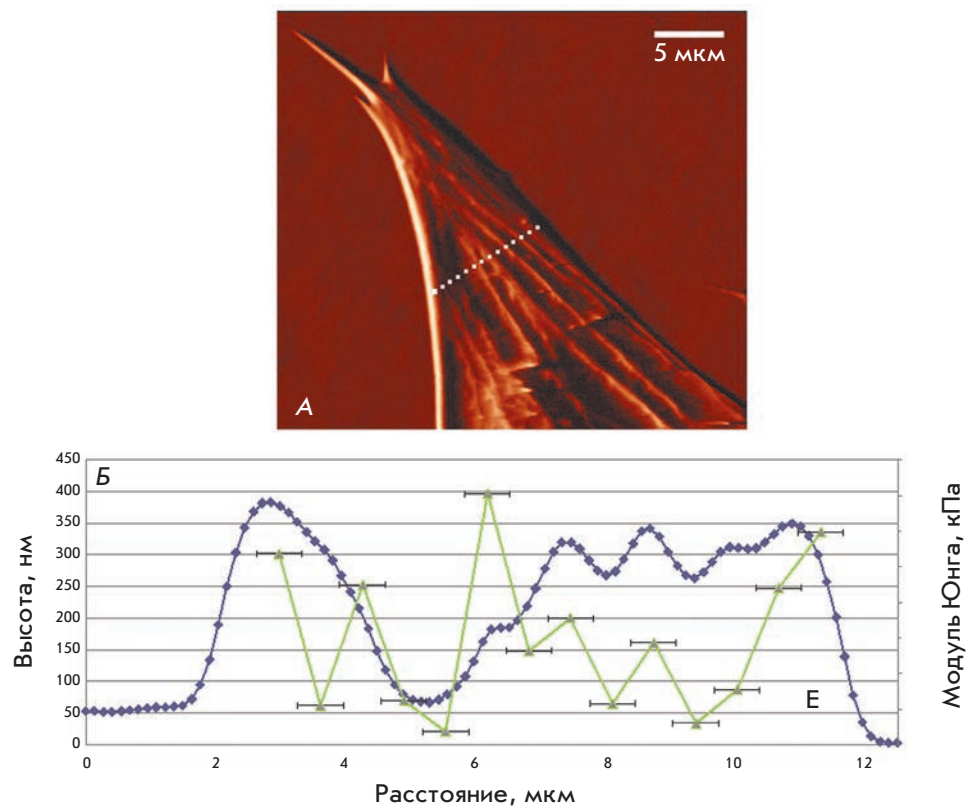


Рис. 5. Картирование модуля Юнга астроцита. **А** – Изображение участка астроцита и линия, вдоль которой снимались силовые кривые (14 точек) и был измерен профиль высоты. **Б** – Профиль сечения вдоль данной линии (синяя кривая) и значения модуля Юнга (зеленые точки) в соответствующих точках. Горизонтальные планки погрешностей отражают размер контактной площадки. Можно видеть, что в точках, попадающих на фибриллы цитоскелета (локальные максимумы на синей кривой), модуль Юнга имеет более высокие значения.



продавливания, в данном эксперименте она равна $\sim 700 \times 700$ нм [31]. Этим может объясняться разброс в значениях модуля упругости, получаемых на элементах цитоскелета. Кроме того, сами фибриллы могут представлять собой пучки собранных вместе филаментов различной плотности, что также может влиять на локальную жесткость клетки. Из диаграмм для значений модуля Юнга (рис. 3) видно, что большинство точек попадает на участки поверхности клеток, под которыми нет цитоскелета.

ВЫВОДЫ

Проведенные эксперименты показывают, что морфология астроцитов органотипической культуры СМГ эмбрионов курицы, культивируемых на желатиновой подложке, может успешно изучаться методом АСМ. Клетки хорошо адгезируются, практически не смещаются в процессе сканирования и обладают высокой жизнеспособностью, что позволяет использовать желатин в качестве дешевой, надежной и удобной подложки для используемой культуры. Высокое разрешение метода АСМ позволяет наблюдать организацию цитоскелета живой клетки в среде культивирования. Несмотря на то что при ви-

зуализации с помощью АСМ невозможно точно, как при конфокальной микроскопии фиксированных препаратов, определить, какую именно из сетей цитоскелета мы наблюдаем, метод АСМ весьма перспективен для изучения цитоскелета, поскольку позволяет работать на живых клетках. Кроме того, поскольку локальный модуль Юнга клетки значительно больше в местах нахождения фибрилл цитоскелета, проведение силовой спектроскопии позволит определять его целостность и степень деградации при повреждающих воздействиях. Особенно интересным представляется исследование изменений целостности цитоскелета культивируемых астроцитов и нейрональных клеток при нейродегенерации. Проведение силовой спектроскопии позволит в дальнейшем быстро, неинвазивно и с высокой точностью определять модуль Юнга живых клеток при изучении деградации цитоскелета – одного из ключевых процессов в развитии нейродегенерации [32]. ●

Работа поддержана ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Montgomery D. // Vet. Pathol. Online. 1994. V. 31. P. 145–167.
- Rodriguez J., Olabarria M., Chvatal A., Verkhratsky A. // Cell Death Differ. 2008. V. 16. P. 378–385.
- Goczalik I., Ulbricht E., Hollborn M., Raap M., Uhlmann S., Weick M., Pannicke T., Wiedemann P., Bringmann A., Reichenbach A., et al. // Investig. Ophthalmol. Vis. Sci. 2008. V. 49. P. 4578–4589.
- Maragakis N.J., Rothstein J.D. // Nat. Clin. Pract. Neurol. 2006. V. 2. P. 679–689.
- Dent E.W., Gertler F.B. // Neuron. 2003. V. 40. P. 209–227.
- Engel A., Muller D.J. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2000. V. 7. P. 715–718.
- Graham H.K., Hodson N.W., Hoyland J.A., Millward-Sadler S.J., Garrod D., Scothern A., Griffiths C.E.M., Watson R.E.B., Cox T.R., Eler J.T. // Matrix Biol. 2010. V. 29. P. 254–260.
- Parpura V., Haydon P.G., Henderson E. // J. Cell Sci. 1993. V. 104. P. 427–432.
- Rotsch C., Radmacher M. // Biophys. J. 2000. V. 78. P. 520–535.
- Ефремов Ю.М., Багров Д.В., Дубровин Е.В., Шайтан К.В., Яминский И.В. // Биофизика. 2011. Т. 56. С. 288–303.
- Lu Y.B., Franze K., Seifert G., Steinhäuser C., Kirchhoff F., Wolburg H., Guck J., Janmey P., Wei E., Käs J., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 17759–17764.
- Butt H.J., Cappella B., Kappl M. // Surf. Sci. Rep. 2005. V. 59. P. 1–152.
- Yamane Y., Shiga H., Haga H., Kawabata K., Abe K., Ito E. // J. Electron Microsc. 2000. V. 49. P. 463–471.
- Kuznetsova T.G., Starodubtseva M.N., Yegorenkov N.I., Chizhike S.A., Zhdanov R.I. // Micron. 2007. V. 38. P. 824–833.
- Kirmizis D., Logothetidis S. // Int. J. Nanomed. 2010. V. 5. P. 137–145.
- Moore K., Macsween M., Shoichet M. // Tissue Eng. 2006. V. 12. P. 267–278.
- Cramer L., Desai A. // Fluorescence Procedures for the Actin and Tubulin Cytoskeleton in Fixed Cells. Protocol at <http://mitchison.med.harvard.edu/protocols/gen1.html>.
- Braet F., Wisse E. // Meth. Mol. Biol. 2004. V. 242. P. 201–217.
- Santacroce M., Orsini F., Perego C., Lenardi C., Castagna M., Mari S.A., Sacchi V.F., Poletti G. // J. Microsc. 2006. V. 223. P. 57–65.
- Costa K.D. // Meth. Mol. Biol. 2006. V. 319. P. 331–361.
- Лебедев Д.В., Чукланов А.П., Бухараев А.А., Дружинина О.С. // Письма в ЖТФ. 2009. Т. 35. С. 54–61.
- Burnham N., Chen X., Hodges C., Matei G.A., Thoreson E.J., Roberts C.J., Davies M.C., Tendler S.J.B. // Nanotechnol. 2003. V. 14. P. 1–6.
- Sader J.E., Chon J.W.M., Mulvaney P. // Rev. Sci. Instrum. 1999. V. 70. P. 3967–3970.
- Sneddon I.N. // Int. J. Eng. Sci. 1965. V. 3. P. 47–57.
- McNally H.A., Borgens R.B. // J. Neurocytol. 2004. V. 33. P. 251–258.
- Yamada K.M., Spooner B.S., Wessells N.K. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1970. V. 66. P. 1206–1212.
- Yamane Y., Hatakeyama D., Tojima T., Kawabata K., Ushiki T., Ogura S., Abe K., Ito E. // Jpn. J. Appl. Phys. 1998. V. 37. P. 3849–3854.
- Firouzi M., Sabouni F., Ziaee A.A., Taghikhani M. // Iran. Biomed. J. 2004. V. 8. P. 101–105.
- Mustata M., Ritchie K., McNally H.A. // J. Neurosci. Meth. 2010. V. 186. P. 35–41.
- Franze K., Reichenbach A., Kas J. // Mechanosensitivity of the Nervous System/ Ed. Kamkin A., Kiseleva I. Dordrecht: Springer Netherlands, 2009. V. 2. P. 173–213.
- Braet F., Rotsch C., Wisse E., Radmacher M. // Appl. Phys. A: Materials Sci. & Processing. 1998. V. 66. P. 575–578.
- George E.B., Glass J.D., Griffin J.W. // J. Neurosci. 1995. V. 15. P. 6445–6452.

УДК 578.226

Эффективный способ доставки гена интерлейкина-2 в гемопоэтические клетки человека с использованием рекомбинантного аденовируса с модифицированным фибером

В. Н. Рогожин^{1,2*}, Д. Ю. Логунов¹, Д. В. Щебляков¹, М. М. Шмаров¹, Е. Е. Ходунова³, И. В. Гальцева³, Р. В. Белоусова², Б. С. Народицкий¹, А. Л. Гинцбург¹

¹ФГБУ Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздравсоцразвития РФ, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

²ФГОУ ВПО Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина, 109472, Москва, ул. Ак. Скрябина, 23

³ФГБУ Гематологический научный центр Минздравсоцразвития РФ, 125167, Москва, Новый Зыковский пр., 4

*E-mail: Rogojin_V@mail.ru

Поступила в редакцию 01.07.2011 г.

РЕФЕРАТ Сконструирован рекомбинантный аденовирус человека серотипа 5 (Ad5/35F-IL2) с модифицированными фиберами, содержащими С-концевой knob-домен фибера аденовируса человека серотипа 35, и несущий ген рекомбинантного интерлейкина-2 человека. Благодаря модификации фиберов аденовирус способен эффективно доставлять генетическую информацию в клетки лейкоцитарной фракции красного костного мозга человека, а также в линии KG-1A (миелоцитарный лейкоз) и U937 (моноцитарный лейкоз) опухолевых клеток крови, в норме резистентных к инфекции аденовирусом человека серотипа 5. Методом проточной цитофлуориметрии установлено, что модифицированный Ad5/35F эффективно проникает в популяции моноцитов, гранулоцитов и бластных клеток красного костного мозга человека. Показана экспрессия интерлейкина-2 в CAR-негативных костномозговых лейкоцитах (3682.52 ± 134.21 пг/мл) и клетках линий KG-1A (748.3 ± 32.8 пг/мл) и U937 (421.5 ± 59.4 пг/мл), трансдуцированных Ad5/35F-IL2. Аденовирус с модифицированным фибером может использоваться в качестве вектора для эффективной доставки гена интерлейкина-2 человека в нормальные и опухолевые клетки гемопоэтического ряда.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА аденовирусный вектор, псевдотипирование, интерлейкин-2, CD46, модификация капсида.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ Ad – аденовирус человека; Ad5 – Ad серотипа 5; Ad35 – Ad серотипа 35; Ad5/35F – рекомбинантный Ad5 с модифицированными фиберами; УФ – ультрафиолетовое излучение; ККМ – красный костный мозг; IL2 – интерлейкин-2 человека; CAR – рецептор коксакивируса-аденовируса; а.о. – аминокислотный остаток; БОЕ – бляшкообразующая единица.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время векторы на основе аденовируса человека серотипа 5 (Ad5) входят в число наиболее часто используемых для доставки генов в клетки человека и млекопитающих. К преимуществам таких векторов относятся: их способность трансдуцировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки [1, 2]; аденовирусная ДНК не встраивается в геном клетки-хозяина и остается в экстрахромосомной форме; аденовирусы могут быть получены в титре более 10^{10} БОЕ/мл, что может позволить использовать их в качестве живых рекомбинантных вакцин;

обеспечение высокого уровня экспрессии целевого гена в клетке-мишени. Один из недостатков векторов на основе Ad5 – их низкая трансдуцирующая активность в отношении CAR-дефицитных и CAR-негативных клеток, среди которых важное место принадлежит клеткам гемопоэтического ряда. Эта проблема обусловлена тем, что для первичного взаимодействия Ad5 с клеткой необходимо связывание капсидного аденовирусного белка – фибера – с мембранным клеточным рецептором CAR (cox-sackievirus-adenovirus receptor). Поэтому дефицит или полное отсутствие этих рецепторов на поверхно-

сти клеток является фактором, лимитирующим эффективную доставку генов с помощью аденовекторов на основе Ad5.

Проблема решается с помощью генетической модификации фибров аденовируса. Стратегия такой модификации заключается в псевдотипировании, т.е. замене фибров или отдельных их доменов на фибры или аналогичные домены аденовирусов других серотипов, использующих для связывания с клеточной поверхностью рецепторы, отличные от CAR. Такой подход впервые применили в 1996 г. Gall J. и соавт., которые получили Ad5, экспрессирующий фибр Ad7, и показали изменение тропизма вектора [3]. Krasnykh V. и соавт. [4] и Stevenson S. и соавт. [5] описали получение химерных Ad5-векторов, содержащих N-концевой и центральный домены фибра Ad5 и C-концевой домен фибра Ad3.

Для эффективной трансдукции клеток гемопоэтического ряда предложена замена фибра Ad5 на фибр Ad35 (Ad5/35F) [6]. Модификация обусловлена тем, что Ad5 и Ad35 для связывания с поверхностью клетки используют различные рецепторы. В случае Ad5 это CAR, а у Ad35 – молекула CD46 [7], высокий уровень экспрессии которой зарегистрирован на поверхности гемопоэтических клеток. Такие химерные аденовирусы способны эффективно трансдуцировать гемопоэтические [6], а также дендритные клетки человека [8].

Мы применили описанную модификацию фибра Ad5 для получения вектора, способного эффективно проникать в CAR-дефицитные гемопоэтические клетки с целью доставки в них гена интерлейкина-2 человека. Получение такого вектора расширяет возможности применения векторов на основе капсид-модифицированных аденовирусов человека, в частности в генной терапии лейкозов различной этиологии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Плазмидные векторы

pZ35 – плазида, содержащая геном Ad5 с knob-доменом фибра Ad35, и pShuttle-CMV-IL2 – челночный вектор, содержащий ген интерлейкина-2 человека под контролем промотора цитомегаловируса человека, сконструированы ранее в ФГБУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи [9]; pShuttle-CMV-EGFP («Stratagene», США).

Вирусы и бактериальные штаммы

Рекомбинантный Ad5, экспрессирующий репортерный ген зеленого флуоресцирующего белка (Ad5-EGFP), рекомбинантный Ad5, экспрессирующий ген интерлейкина-2 человека (Ad5-IL2), полученные ра-

нее в ФГБУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи [9, 10], *Escherichia coli* штаммы DH5 α и BJ5183.

Клеточные линии

В работе использовали перевиваемые линии культур клеток человека: НЕК-293 (клетки эмбриональной почки, трансформированные областью E1 генома Ad5), KG-1A (клетки миелоцитарного лейкоза), U937 (клетки моноцитарного лейкоза), а также первичную культуру лейкоцитов красного костного мозга (ККМ), полученную от здорового донора.

Получение рекомбинантных аденовирусов

Плазмидные конструкции, несущие полноразмерный геном аденовируса с модифицированным фибром (Ad5/35F) и целевым геном в составе генома, получали с использованием гомологичной рекомбинации в *E. coli* BJ5183. С этой целью клетки *E. coli* котрансформировали парой плазмид: pZ35 и pShuttle-CMV-EGFP – для получения плазмиды с полноразмерным геномом Ad5/35F с репортерным геном зеленого флуоресцирующего белка (pAd5/35F-EGFP), и pZ35 и pShuttle-CMV-IL2 – для получения плазмиды с полноразмерным геномом Ad5/35F с геном интерлейкина-2 человека (pAd5/35F-IL2). Перед трансформацией плазмиды pZ35 и челночные векторы с целевыми генами (pShuttle-CMV-EGFP и pShuttle-CMV-IL2) линеаризовали рестриктазами PacI и PmeI соответственно. В челночных векторах целевые гены (EGFP и IL2) находились под контролем промотора цитомегаловируса человека. Рекомбинантные клоны анализировали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и рестрикционного картирования. Рекомбинантные модифицированные аденовекторы Ad5/35F-EGFP и Ad5/35F-IL2 получали путем липофекции плазмидных конструкций (pAd5/35F-EGFP и pAd5/35F-IL2) в клетки пакующей линии НЕК-293 с использованием реагента Metafectene Pro («Biontex», Германия) согласно прилагаемой методике. Рекомбинантные аденовирусы накапливали в клетках линии НЕК-293 и детектировали по развитию характерного цитопатического эффекта. Присутствие целевых генов и модификацию фибра подтверждали методами ПЦР и рестрикционного картирования. Рекомбинантные модифицированные аденовирусы очищали и концентрировали ультрацентрифугированием лизатов зараженных клеток в градиенте плотности хлористого цезия. Концентрацию аденовируса в очищенном препарате определяли спектрофотометрически ($\lambda = 260$ нм), используя коэффициент пересчета 1 о.е. = 1.12×10^{12} вирусных частиц/мл. Титр аденовирусных препаратов определяли методом бляшкообразования на клетках линии НЕК-293.

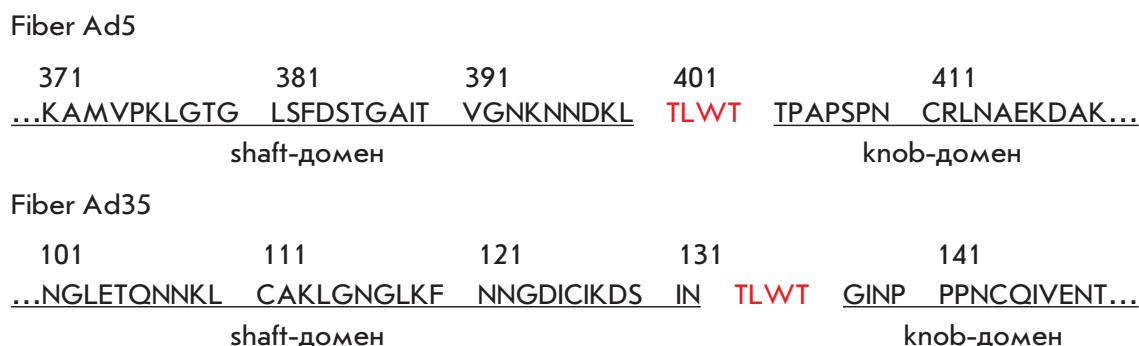


Рис. 1. Аминокислотные последовательности С-концевых областей фибров аденовирусов человека серотипов 5 и 35.

Определение физической стабильности модифицированных аденовирионов

Физическую стабильность модифицированных аденовирусов оценивали на модели Ad5/35F-EGFP, определяя его термостабильность, как описано ранее [11].

Трансдукция рекомбинантными аденовирусами линий KG-1A и U937 опухолевых клеток крови человека

Линии клеток KG-1A и U937 рассеивали в 48-луночные планшеты в концентрации 5×10^4 клеток на лунку. Клетки лейкоцитарной фракции ККМ человека, полученные от здорового донора, выделяли путем двойного центрифугирования в градиенте плотности коммерческого препарата Histopaque-1083 («Sigma-Aldrich», Германия) согласно прилагаемой методике и рассеивали в 48-луночные планшеты по 5×10^4 клеток на лунку. На следующий день клетки инфицировали рекомбинантными модифицированными аденовирусами Ad5/35F-EGFP и Ad5/35F-IL2, а также контрольными аденовирусами с фибрами вируса дикого типа и с аналогичными целевыми генами – Ad5-EGFP и Ad5-IL2, в дозе 5×10^3 , 10^4 и 5×10^4 вирусных частиц на клетку.

Анализ эффективности проникновения аденовирусов в клетки и уровня экспрессии целевого гена

Эффективность проникновения рекомбинантных аденовирусов Ad5-EGFP и Ad5/35F-EGFP в клетки оценивали через 48 ч после заражения с помощью флуоресцентной микроскопии зараженных клеток по интенсивности флуоресценции EGFP.

Уровень экспрессии гена IL2 человека в клетках, инфицированных Ad5-IL2 и Ad5/35F-IL2, оценивали через 48 ч после заражения, определяя концентрацию IL2 в культуральной среде инфицированных клеток методом проточной цитофлуориметрии с использованием набора «FlowCytomix BenderMedsys-

tems» (Австрия) согласно прилагаемой методике. Концентрацию IL2 в образцах рассчитывали, используя программу FlowCytomix Pro 2.2.

Определение популяций лейкоцитов ККМ человека, эффективно трансдуцируемых модифицированным аденовирусом

Для определения популяций лейкоцитов ККМ человека, в которые способен проникать модифицированный аденовирус, клетки инфицировали Ad5/35F-EGFP в дозе 10^4 вирусных частиц на клетку. Через 24 ч после заражения методом проточной цитофлуориметрии с использованием флуоресцентно меченых антител против CD45 (общего лейкоцитарного антигена) определяли популяции лейкоцитов ККМ: моноциты, гранулоциты, Т- и В-лимфоциты, а также бластные клетки. Зараженные вирусом клетки детектировали по флуоресценции EGFP и соотносили с соответствующей популяцией лейкоцитов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение рекомбинантных аденовирусов человека серотипа 5 с модифицированными фибрами

Первая технология получения рекомбинантного аденовируса Ad5/35F, описанная Shayakhmetov D.M. и соавт. [6], заключалась в замене центрального (shaft) и С-концевого (knob) доменов фибера Ad5 на аналогичные домены фибера Ad35. Для создания такого модифицированного вируса мы использовали новую технологию, основанную на замене лишь С-концевого knob-домена фибера Ad5 на knob-домен фибера Ad35, так как известно, что сайт связывания Ad35 с молекулой CD46 находится внутри knob-домена фибера [7]. С-Концевой knob- и центральный shaft-домены фибров аденовирусов соединены короткой аминокислотной последовательностью, обеспечивающей относительную подвижность наиболее удаленного

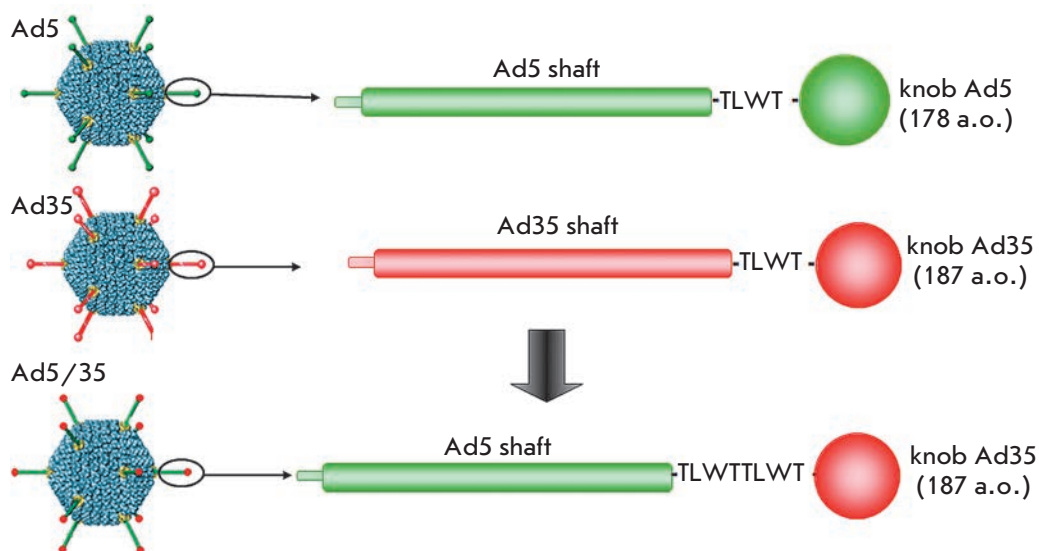


Рис. 2. Схема модификации фибров аденовируса человека серотипа 5 путем замены его С-концевого knob-домена на аналогичный домен фибера аденовируса человека серотипа 35.

от основания пентона knob-домена фибера. Большинство аденовирусов человека содержат в подвижной области между этими доменами консервативную последовательность – треонин–лейцин–триптофан–треонин (TLWT) [12]. На N-конце knob-домена фибров Ad5 и Ad35 также находится эта последовательность (рис. 1).

Таким образом, для корректного соединения shaft-и knob-доменов фибера мы заменили knob-домен фибера Ad5 (178 а.о.) на knob-домен фибера Ad35 (187 а.о.) после последовательности TLWT (рис. 2), чтобы расширить тропизм вируса в отношении CD46-позитивных клеток.

Характеристика рекомбинантных модифицированных аденовирусов Ad5/35F

Рекомбинантные модифицированные аденовирусы Ad5/35F-EGFP и Ad5/35F-IL2 были охарактеризо-

ваны по следующим параметрам: концентрации вирусных частиц в препарате, титру аденовирусного препарата (таблица) и физической стабильности аденовирионов при нагревании (рис. 3). В качестве контроля использовали препараты немодифицированных Ad5, содержащих экспрессирующие кассеты с генами EGFP (Ad5-EGFP) и IL2 человека (Ad5-IL2). Как видно из таблицы, концентрации и титры препаратов модифицированных аденовирусов сопоставимы с аналогичными показателями контрольных препаратов немодифицированных аденовирусов. Таким образом, модификация фибера аденовируса Ad5/35F не повлияла существенно на его репродукцию.

Так как введенная нами модификация фибров аденовирусов могла каким-либо образом отразиться на физической стабильности аденовирионов, мы оценили устойчивость Ad5/35F-EGFP к нагреванию до +37 и +42°C в течение различного времени в сравнении с устойчивостью немодифицированного Ad5-EGFP. Показано, что термостабильность вирионов Ad5/35F-EGFP соизмерима с термостабильностью немодифицированных аденовирионов Ad5-EGFP. Прогревание образцов аденовирусов в течение 30 мин при +37°C не приводило к значимому снижению их инфекционности (рис. 3А). Инкубация аденовирусов при +42°C приводила к инаktivации аденовирионов в обоих образцах – на 11–19% через 15 мин и на 23–45% через 30 мин прогревания (рис. 3Б).

Данные о термостабильности аденовируса Ad5/35F-EGFP свидетельствуют о том, что представленная модификация фибров аденовируса не влияет значительно на его физическую стабильность.

Концентрация и титр рекомбинантных аденовирусов

Вирус	Концентрация, вирусные частицы/мл	Титр, БОЕ/мл
Ad5-EGFP	$(4.82 \pm 0.17) \times 10^{12}$	$(3.80 \pm 0.83) \times 10^{10}$
Ad5/35F-EGFP	$(2.54 \pm 0.21) \times 10^{12}$	$(1.22 \pm 0.34) \times 10^{10}$
Ad5-IL2	$(6.97 \pm 0.19) \times 10^{12}$	$(5.85 \pm 0.76) \times 10^{10}$
Ad5/35F-IL2	$(4.23 \pm 0.17) \times 10^{12}$	$(2.12 \pm 0.26) \times 10^{10}$

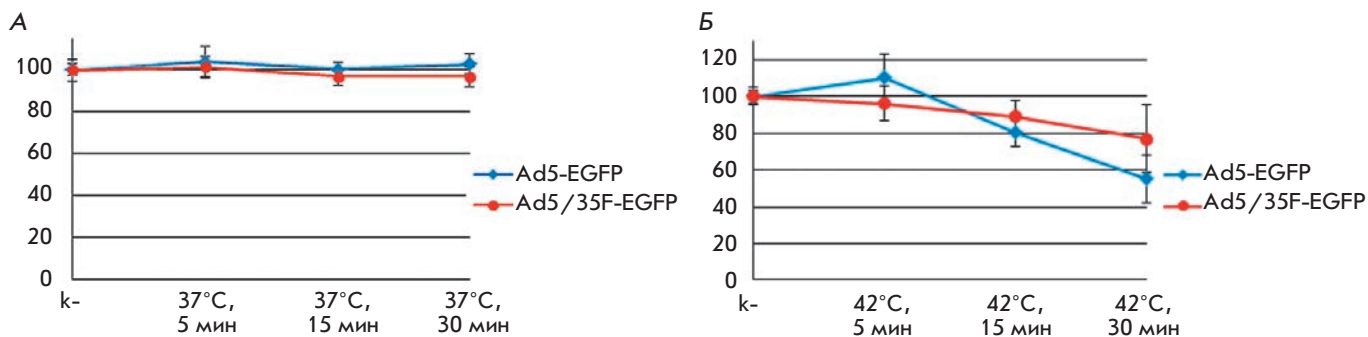


Рис. 3. Термостабильность аденовирионов с модифицированными фиберами (Ad5/35F-EGFP) в сравнении с немодифицированными аденовирионами (Ad5-EGFP). А – Прогревание образцов аденовирусов при +37°C в течение 5, 15 и 30 мин. Б – Прогревание образцов аденовирусов при +42°C в течение 5, 15 и 30 мин. По оси абсцисс – условия прогревания, по оси ординат – относительная эффективность проникновения аденовируса в клетки НЕК-293, оцененная по флуоресценции EGFP, %.

Оценка эффективности доставки генетической информации аденовирусами Ad5/35F-EGFP и Ad5/35F-IL2 в гемопоэтические опухолевые клетки человека линий KG-1A и U937

Для оценки эффективности проникновения аденовирусов Ad5/35F-EGFP и Ad5/35F-IL2 в опухолевые клетки крови человека *in vitro* и определения уровня экспрессии целевых генов в трансдуцированных вирусом клетках были выбраны линии KG-1A (клетки миелоцитарного лейкоза) и U937 (клетки моноцитарного лейкоза), характеризующиеся низким уровнем экспрессии первичного аденовирусного рецептора CAR [13], но высоким уровнем экспрессии CD46 [14]. Множественность инфекции составляла 5×10^3 , 10^4

и 5×10^4 вирусных частиц на клетку. Эффективность проникновения Ad5/35F-EGFP в клетки оценивали по количеству клеток, экспрессирующих репортерный ген EGFP и флуоресцирующих при УФ-облучении ($\lambda = 395$ нм). Показано, что благодаря модификации фибера модифицированный Ad5/35F-EGFP более эффективно, чем немодифицированный вирус, проникал в линии U937 и KG-1A опухолевых клеток гемопоэтического ряда (рис. 4). Полученные результаты согласуются с данными других авторов, изучавших эффективность проникновения модифицированного вируса Ad5/35F-EGFP в опухолевые клетки крови других линий [6] и в первичные клетки лимфоидного и миелоидного лейкоза [15].

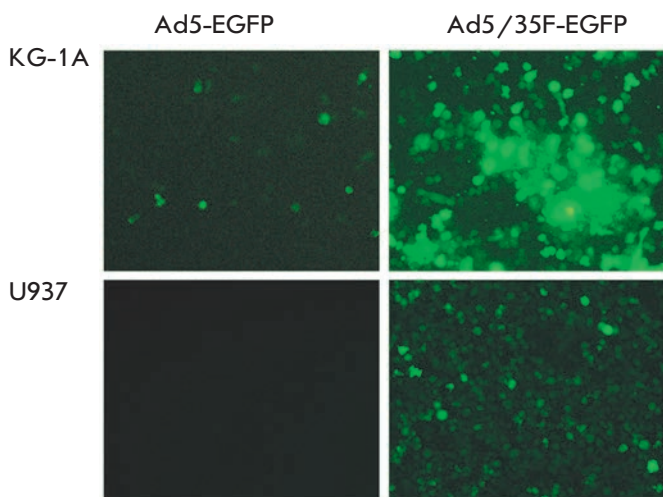


Рис. 4. Эффективность проникновения модифицированного вируса Ad5/35F-EGFP в линии KG-1A и U937 опухолевых клеток крови человека через 48 ч после заражения.

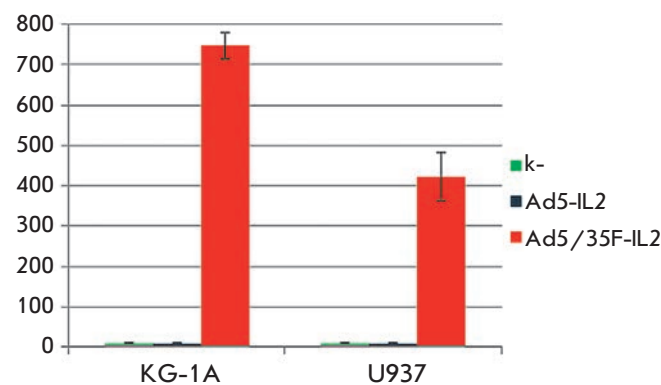


Рис. 5. Уровень экспрессии гена интерлейкина-2 человека в линиях KG-1A и U937 опухолевых клеток крови человека, трансдуцированных рекомбинантными аденовирусами, через 48 ч после заражения. По оси ординат – концентрация интерлейкина-2 в культуральной среде зараженных клеток, пг/мл.

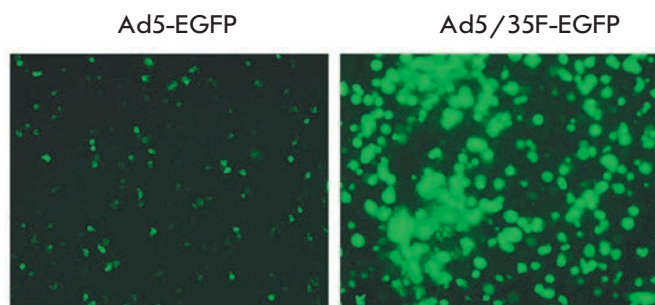


Рис. 6. Эффективность проникновения модифицированного вируса Ad5/35F-EGFP в лейкоциты ККМ человека через 48 ч после заражения.

Эффективность экспрессии гена интерлейкина-2 человека в использованных клеточных линиях, трансдуцированных рекомбинантным модифицированным аденовирусом Ad5/35F-IL2, оказалась значительно выше, чем в клетках, трансдуцированных немодифицированным Ad5-IL2 (рис. 5). Наибольшая концентрация IL2 отмечена в культуральной среде клеток линии KG-1A (748.3 ± 32.8 пг/мл), инфицированных Ad5/35F-IL2. Клетки линии U937, трансдуцированные модифицированным аденовирусом, экспрессировали ген IL2 на уровне 421.5 ± 59.4 пг/мл. Клетки, трансдуцированные немодифицированным вирусом Ad5-IL2, экспрессировали следовые количества IL2.

Эти результаты согласуются с данными об уровне молекул CAR и CD46 – первичных рецепторов для адгезии Ad5 и Ad35, на поверхности исследованных клеточных линий. Известно, что клетки гемопоэтического ряда, в том числе клетки линий KG-1A и U937, являются CAR-негативными [13]. Поэтому вполне логично, что немодифицированные Ad5 практически не проникали в эти клетки, а экспрессия целевых генов в них детектировалась в следовых количествах. В то же время, благодаря высокому уровню экспрессии CD46 на поверхности клеток линий KG-1A и U937 [14] модифицированные Ad5/35F обладали повышенной способностью проникать в эти клетки, что обеспечивало высокий уровень экспрессии целевых генов в них.

Оценка эффективности доставки генетической информации в нормальные лейкоциты красного костного мозга (ККМ) человека рекомбинантными модифицированными аденовирусами

Модифицированный аденовирус Ad5/35F эффективно трансдуцирует CAR-негативные опухолевые клетки крови и обеспечивает экспрессию в них целевых генов, введенных в его геном, поэтому мы реши-

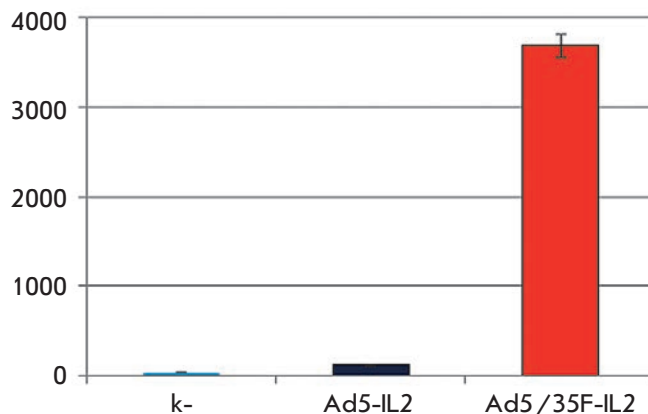


Рис. 7. Уровень экспрессии интерлейкина-2 в лейкоцитах ККМ человека, трансдуцированных рекомбинантными аденовирусами, через 48 ч после заражения.

ли определить эффективность доставки генетической информации аденовекторами – Ad5/35F-EGFP и Ad5/35F-IL2, в клетки лейкоцитарной фракции ККМ, полученного от здорового донора. Этот интерес объясняется возможностью использования модифицированного аденовируса в качестве вектора для эффективной селективной доставки генетической информации в гемопоэтические и иммунокомпетентные клетки человека *ex vivo*. Для этого лейкоциты, выделенные из образца ККМ здорового донора, трансдуцировали модифицированными (Ad5/35F-EGFP и Ad5/35F-IL2) и немодифицированными (Ad5-EGFP и Ad5-IL2) аденовекторами в различных дозах. В результате было показано, что модифицированный вектор Ad5/35F-EGFP более эффективно, чем Ad5-EGFP, проникал в лейкоциты ККМ, о чем свидетельствует интенсивная флуоресценция 80% всех клеток, обусловленная экспрессией EGFP (рис. 6). При трансдукции клеток векторами с целевым геном IL2 в культуральной среде клеток, инфицированных модифицированным Ad5/35F-IL2, концентрация IL2 составила 3682.52 ± 134.21 пг/мл, что приблизительно в 30 раз превысило концентрацию IL2 в культуральной среде лейкоцитов, трансдуцированных немодифицированным Ad5-IL2 (рис. 7).

Учитывая, что клетки лейкоцитарной фракции ККМ содержат множество разнородных популяций клеток, мы решили определить популяции лейкоцитов, в которые эффективно проникает модифицированный аденовирус.

Лейкоциты ККМ были инфицированы модифицированным Ad5/35F-EGFP в дозе 5×10^4 вирусных частиц на клетку. Спустя 24 ч после заражения методом проточной цитофлуориметрии с использованием флуоресцентно меченных антител против общего

лейкоцитарного антигена – CD45, по распределению популяций лейкоцитов по размеру клеток и по уровню экспрессии антигена CD45, а также по флуоресценции инфицированных клеток, обусловленной экспрессией репортерного гена *EGFP*, были выявлены популяции клеток, эффективно трансдуцируемые модифицированным аденовирусом (рис. 8). Как и ожидалось, Ad5/35F-EGFP хорошо проникал в моноциты ККМ (32.66% EGFP-положительных клеток), что подтверждает ранее полученные данные [16], а также трансдуцировал гранулоциты (42.86% EGFP-положительных клеток) и бластные клетки (27.24% EGFP-положительных клеток), что показано впервые. В то же время эффективность проникновения модифицированного аденовируса Ad5/35F-EGFP в субпопуляции Т- и В-лимфоцитов ККМ человека была низкой (0.71% EGFP-положительных клеток). Данные об эффективной трансдукции модифицированным аденовирусом Ad5/35F-EGFP популяций моноцитов, гранулоцитов и бластных клеток согласуются с сообщениями о высоком уровне экспрессии CD46 в популяциях этих клеток [17]. Однако, несмотря на данные об уровне транскрипции гена *CD46* в Т- и В-лимфоцитах, сравнимом с уровнем в клетках миелоцитарной ветви дифференцировки [17, 18], модифицированный аденовирус не проникал эффективно в лимфоциты. Возможно, этот факт может быть обусловлен специфической регуляцией экспрессии *CD46* на уровне белка.

ВЫВОДЫ

С использованием оригинальной модификации, заключающейся в замене С-концевого knob-домена фибера Ad5 на аналогичный домен фибера Ad35, получен рекомбинантный Ad5, содержащий модифицированный фибер и несущий ген *IL2* человека. На культурах линий KG-1A и U937 опухолевых клеток крови человека показано многократное увеличение эффективности проникновения этого вектора в клетки по сравнению с немодифицированным вектором. В опытах по трансдукции первичной культуры лейкоцитов ККМ здорового донора впервые показано 30-кратное увеличение эффективности проникновения модифицированного вектора в сравнении с немодифицированным, что обеспечивает в них экспрессию гена интерлейкина-2 челове-

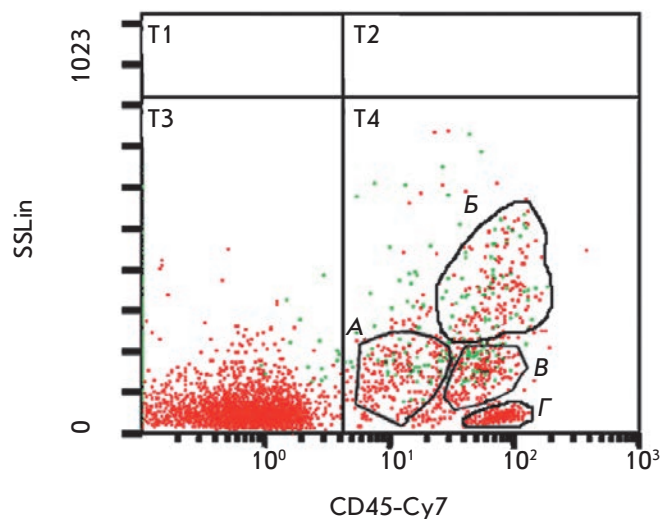


Рис. 8. Определение популяций лейкоцитов ККМ человека, эффективно трансдуцируемых рекомбинантным модифицированным аденовирусом Ad5/35F-EGFP. Зеленым отмечены инфицированные аденовирусом клетки (флуоресцирующие). А – Бластные клетки; Б – гранулоциты; В – моноциты; Г – лимфоциты.

ка. Наряду с эффективной трансдукцией моноцитов ККМ [16] впервые показано, что модифицированный Ad5/35F эффективно трансдуцирует гранулоциты и бластные клетки ККМ человека, в то время как в субпопуляции Т- и В-лимфоцитов этот вектор не проникает.

Основываясь на результатах нашей работы, можно полагать, что полученный нами модифицированный аденовирус Ad5/35F-IL2 может использоваться в качестве вектора для эффективной доставки гена интерлейкина-2 человека и применения его в генной терапии лейкозов различного типа, а также для создания генно-инженерных вакцин, которые способны эффективно доставлять гены антигенов различных патогенов непосредственно в иммунокомпетентные клетки, в том числе и дендритные, являющиеся профессиональными антиген-презентирующими клетками [19]. ●

Работа поддержана Министерством образования и науки РФ (ГК № 02.512.11.2320).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tang D.C., Jennelle R.S., Shi Z., Garver R.I., Carbone D.P., Loya F., Chang C.H., Curiel D.T. // *Hum. Gene Ther.* 1997. V. 8. № 17. P. 2117–2124.
2. Tang D.C., Johnston S.A., Carbone D.P. // *Cancer Gene Ther.* 1994. V. 1. № 1. P. 15–20.
3. Gall J., Kass-Eisler A., Leinwand L., Falck-Pedersen E. // *J. Virol.* 1996. V. 70. № 4. P. 2116–2123.
4. Krasnykh V.N., Mikheeva G.V., Douglas J.T., Curiel D.T. // *J. Virol.* 1996. V. 70. P. 6839–6846.
5. Stevenson S.C., Rollence M., Marshall-Neff J., McClelland A. // *J. Virol.* 1997. V. 71. № 6. P. 4782–4790.

6. Shayakhmetov D.M., Papayannopoulou T., Stamatoyannopoulos G., Lieber A. // *J. Virol.* 2000. V. 74. P. 2567–2583.
7. Zhang Y., Bergelson J.M. // *J. Virol.* 2005. V. 79. № 19. P. 12125–12131.
8. Melief C.J., Offringa R. // *J. Immunol.* 2001. V. 166. P. 5236–5244.
9. Shmarov M.M., Cherenova L.V., Shashkova E.V., Logunov D.Iu., Verkhovskaia L.V., Kapitonov A.V., Neugodova G.L., Doronin K.K., Naroditskii B.S. // *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.* 2002. V. 2. P. 30–35.
10. Logunov D.Y., Zubkova O.V., Karyagina-Zhulina A.S., Shuvalova E.A., Karpov A.P., Shmarov M.M., Tutykhina I.L., Alyapkina Y.S., Grezina N.M., Zinovieva N.A., Ernst L.K., Gintsburg A.L., Naroditsky B.S. // *J. Virol.* 2007. V. 81. № 18. P. 9641–9652.
11. Рогожин В.Н., Белоусова Р.В., Логунов Д.Ю., Шмаров М.М., Лунин В.Г., Народицкий Б.С. // *Вет. медицина.* 2011. № 2. С. 10–13.
12. Guardado-Calvo P., Llamas-Saiz A.L., Fox G.C., Langlois P., van Raaij M.J. // *J. Gen. Virol.* 2007. № 88. Pt 9. P. 2407–2416.
13. Sakurai F., Mizuguchi H., Yamaguchi T., Hayakawa T. // *Mol. Ther.* 2003. V. 8. № 5. P. 813–821.
14. Gaggar A., Shayakhmetov D.M., Liszewski M.K., Atkinson J.P., Lieber A. // *J. Virol.* 2005. V. 79. № 12. P. 7503–7513.
15. Nilsson M., Ljungberg J., Richter J., Kiefer T., Magnusson M., Lieber A., Widegren B., Karlsson S., Fan X. // *J. Gene Med.* 2004. V. 6. № 6. P. 631–641.
16. Segerman A., Lindman K., Mei Y.F., Allard A., Wadell G. // *Virology.* 2006. V. 349. № 1. P. 96–111.
17. Christmas S.E., de la Mata Espinosa C.T., Halliday D., Buxton C.A., Cummerson J.A., Johnson P.M. // *Immunology.* 2006. V. 119. № 4. P. 522–528.
18. Wang G., Liszewski M.K., Chan A.C., Atkinson J.P. // *J. Immunol.* 2000. V. 164. № 4. P. 1839–1846.
19. Wang H., Liu Y., Li Z., Tuve S., Stone D., Kalyushniy O., Shayakhmetov D., Verlinde C.L., Stehle T., McVey J., et al. // *J. Virol.* 2008. V. 82. № 21. P. 10567–10579.

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.