

Письмо редакторов

Уважаемые читатели! Редакционная коллегия и редакционный совет предлагают Вашему вниманию 9-й номер журнала *Acta Naturae*. Мы сохранили традиционную рубрику номера и предлагаем Вам несколько, на наш взгляд, интересных обзоров, оригинальных статей и раздел «Форум». К сожалению, несмотря на приложенные усилия, нам пока не удалось привлечь к сотрудничеству врачей-клиницистов, специалистов в области экспериментальной медицины. В последующих номерах мы были бы рады видеть серьезные исследования отечественных и зарубежных ученых в области фундаментальной медицины. Не случайно, в Российской академии наук создано новое отделение, призванное сконцентрировать свои усилия в этой области. В этой связи мы обращаемся к членам вновь созданного отделения поделиться наиболее интересными разработками, а также выступить в ближайших номерах журнала в разделе «Форум».

Вниманию читателей предлагается обзор В.В. Плешкана с соавт., посвященный генной терапии меланомы. Обзор отражает, на наш взгляд, современные тенденции направленной терапии злокачественных опухолей. Обзор М.В. Нестерчука и др. затрагивает весьма интересную область посттрансляционных модификаций рибосомных белков прокариотической клетки. Несмотря на огромный пул работ по прокариотической рибосоме, включая современные рентгеноструктурные исследования, функциональная роль посттрансляционных модификаций рибосомных белков остается загадкой. Обзор Л.А. Дыкмана и Н.Г. Хлебцова посвящен золотым наночастицам и их применению в биологии и медицине. Обзор содержит весьма обширный библиографический материал и будет интересен не только зрелым исследователям, но и аспирантам и студентам.

Экспериментальные статьи номера открываются серьезным популяционным генетическим исследованием В.А. Степанова с соавт. В номере традиционно публикуются статьи по компонентам врожденного иммунитета. Структурно-функциональное исследование токсического для эукариотических клеток антимикробного пептида Ltc1-K представлено в работе О.В. Самсоновой с соавт. Работа К.В. Лобанова с соавт. затрагивает крайне перспективную тему механизм-зависимого терапевтического действия лекарственных препаратов. Традиционно сильными являются работы в области физической химии трансмембранных белков (К.С. Минеев с соавт.). Клиническая работа с использованием современных методов ДНК-диагностики представлена коллективом авторов (О.А. Зорина с соавт.). Приятно, что в журнале стали появляться работы и в области физиологии. В данном случае следует упомянуть статью Ю.Г. Одношвикиной с соавт., посвященную активации β 2-адренорецепторов.

Раздел «Форум» представляет вниманию читателей информацию о визите делегации Национального института здоровья (NIH, США) в Российскую академию наук. Статья освещает перспективы международного сотрудничества и подчеркивает, что после неестественно длительного перерыва в официальных научных контактах обе стороны нашли в себе силы возобновить диалог. В разделе также публикуется интервью с заместителем министра Минобрнауки Сергеем Иванцом, посвященное актуальному сектору финансирования отечественной науки – проблеме «150 миллионных грантов». В интервью содержатся некоторые положения, которые разделяются не всеми членами редколлегии и редсовета журнала. Однако мы всегда были за многополярность мнений в данном разделе и намерены и далее публиковать интересные материалы и статьи на интересующие отечественных исследователей темы. ●

Наука и технологии России – STRF.ru



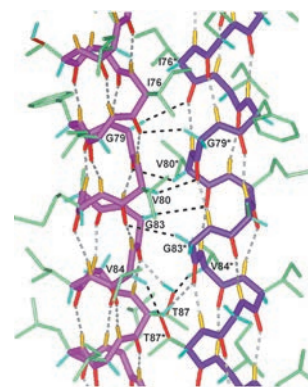
- 40% учёных согласны с тем, что публикации о результатах научной работы способствуют просвещению общества, росту престижа профессии учёного, улучшению имиджа науки
- 34% считают, что, распространяя информацию о результатах своей работы, они смогут привлечь клиентов, партнёров, деньги
- 12% надеются,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

К. С. Минеев, Э. В. Бочаров, П. Е. Волынский, М. В. Гончарук,
Е. Н. Ткач, Я. С. Ермолюк, А. А. Шульга, В. В. Чупин,
И. В. Масленников, Р. Г. Ефремов, А. С. Арсеньев

Структура димера трансмембранного домена гликофорина А в окружении липидов и детергентов

В настоящей работе методами гетероядерной спектроскопии ЯМР и молекулярной динамики проведено сравнительное исследование влияния разных мембраноподобных сред на конформацию димеризующегося трансмембранного домена битопного белка. На примере гликофорина А показано, что две широко используемые среды в виде детергентных мицеллДФХ и липидных бицелл ДМФХ/ДГФХ позволяют проводить структурно-динамические исследования специфических взаимодействий между трансмембранными α -спиралями. Однако ряд особенностей ставит липидные бицеллы ближе по своим характеристикам к природному липидному бислою.



Центральная часть интерфейса димеризации GpA в бицеллах.

Реконструкция пуринового метаболизма у *Bacillus subtilis* с целью получения штамма-производителя AICAR – нового препарата широкого терапевтического применения

AICAR – природное соединение, аналог и предшественник аденозина. Будучи активатором протеинкиназы, AICAR имеет широкий терапевтический потенциал, поскольку он нормализует углеводный и липидный обмен и ограничивает пролиферацию опухолевых клеток. Синтез AICAR в клетках *Bacillus subtilis* контролируется ферментами биосинтеза пуринов, гены которых входят в состав пуринового оперона (*pur*-оперона). Проведена реконструкция пуринового метаболизма в клетках штамма *B. subtilis*, направленная на сверхпродукцию AICAR. Полученный в результате проведенных генетических манипуляций штамм *B. subtilis* накапливает 11–13 г/л AICAR в культуральной жидкости.

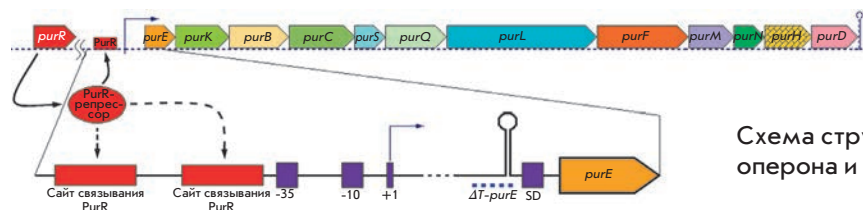
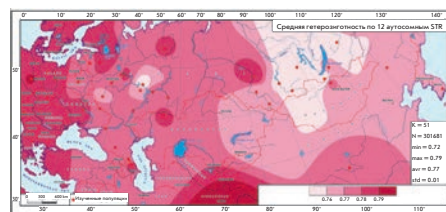


Схема структурной организации *pur*-оперона и его регуляции.

В. А. Степанов, О. П. Балановский, А. В. Мельников, А. Ю. Лаш-Завада, В. Н. Харьков, Т. В. Тяжелова,
В. Л. Ахметова, О. В. Жукова, Ю. В. Шнейдер, И. Н. Шильникова, С. А. Боринская, А. В. Марусин,
М. Г. Спиридонова, К. В. Симонова, И. Ю. Хитринская, М. О. Раджабов, А. Г. Романов, О. В. Штыгашева,
С. М. Кошель, Е. В. Балановская, А. В. Рыбакова, Э. К. Хуснутдинова, В. П. Пузырев, Н. К. Янковский

Характеристика популяций Российской Федерации по панели пятнадцати локусов, используемых для ДНК-идентификации и в судебно-медицинской экспертизе

Впервые с использованием панели из 15 генетических маркеров, применяемых для ДНК-идентификации и в судебно-медицинской экспертизе, охарактеризованы 17 популяций Российской Федерации. Выявлены значительные отличия российских популяций от референтной базы США, используемой в практике судебной экспертизы РФ. Обоснована необходимость учета популяционно-генетической структуры населения при судебно-медицинских исследованиях и ДНК-идентификации личности в криминалистике.



Карта изменчивости уровня средней гетерозиготности 12 аутосомных микросателлитных локусов.

Acta Naturae

ТОМ 3, № 2 (9), АПРЕЛЬ—ИЮНЬ 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

Корректура: 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 15 мая 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

Интервью с зам. министра образования и науки РФ
Сергеем Иванцом

Повышение в классе 6

В. Н. Даниленко

Сотрудничество в области биомедицинских исследований между учеными США и России 9

ОБЗОРЫ

В. В. Плешкан, И. В. Алексеенко, М. В. Зиновьева,
Т. В. Виноградова, Е. Д. Свердлов

Промоторы со специфической активностью в раковых клетках при генной терапии меланомы 14

М. В. Нестерчук, П. В. Сергиев, О. А. Донцова

Посттрансляционные модификации рибосомных белков *Escherichia coli* 24

Л. А. Дыкман, Н. Г. Хлебцов

Золотые наночастицы в биологии и медицине: достижения последних лет и перспективы 36

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

В. А. Степанов, О. П. Балановский,
А. В. Мельников, А. Ю. Лаш-Завада, В. Н. Харьков,
Т. В. Тяжелова, В. Л. Ахметова, О. В. Жукова,
Ю. В. Шнейдер, И. Н. Шильникова, С. А. Боринская,
А. В. Марусин, М. Г. Спиридонова, К. В. Симонова,
И. Ю. Хитринская, М. О. Раджабов, А. Г. Романов,
О. В. Штыгашева, С. М. Кошель, Е. В. Балановская,
А. В. Рыбакова, Э. К. Хуснутдинова, В. П. Пузырев,
Н. К. Янковский

**Характеристика популяций
Российской Федерации по панели
пятнадцати локусов, используемых
для ДНК-идентификации и в судебно-
медицинской экспертизе** 59

О. В. Самсонова, К. С. Кудряшова, А. В. Феофанов
**N-Концевой участок антимикробного
пептида Ltc1-K усиливает его
токсичность для клеток эукариот** 72

К. В. Лобанов, Л. Эрраис Лопес,
Н. В. Королькова, Б. В. Тяглов, А. В. Глазунов,
Р. С. Шакулов, А. С. Миронов
**Реконструкция пуринового метаболизма
у *Vacillus subtilis* с целью получения
штамма-продуцента AICAR — нового
препарата широкого терапевтического
применения** 83

К. С. Минеев, Э. В. Бочаров, П. Е. Вольнский,
М. В. Гончарук, Е. Н. Ткач, Я. С. Ермолюк,
А. А. Шульга, В. В. Чупин, И. В. Масленников,
Р. Г. Ефремов, А. С. Арсеньев
**Структура димера трансмембранного
домена гликофорина А в окружении
липидов и детергентов** 94

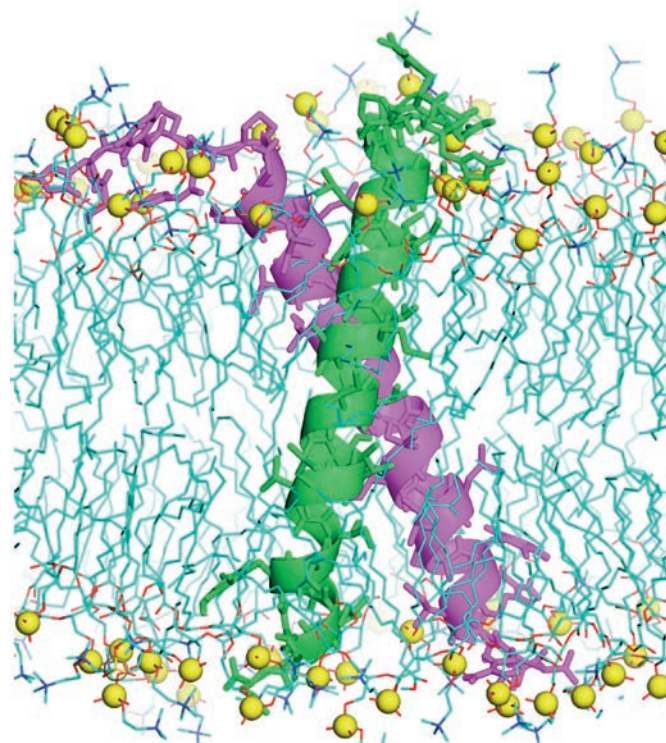
О. А. Зорина, А. А. Кулаков, О. А. Борискина,
Д. В. Ребриков

**Соотношение патогенных
представителей микробиоценоза
пародонтальных карманов при пародонтите
разной степени тяжести** 103

Ю. Г. Одношивкина, А. М. Петров, А. Л. Зефирова
**Влияние активации β_2 -адренорецепторов
в предсердиях мыши на силу
сокращения, Са-сигналы
и продукцию оксида азота** 107

Правила для авторов 118

ERRATUM 120

**РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ**

Структура димера GrA1m после МД-релаксации
в бислое ДМФХ. (См. статью Минеева и др.)

Повышение в классе

Минобрнауки России объявило о проведении второго этапа открытого публичного конкурса на получение грантов в размере до 150 миллионов рублей каждый. Научные исследования будут проводиться под руководством ведущих ученых со всего мира в российских вузах. Об особенностях экспертизы проектов и о том, как приспособить беспрецедентные для нашей страны конкурсы к российским реалиям рассказал заместитель министра образования и науки РФ Сергей Иванец в интервью руководителю проекта «Наука и технологии РФ» Константину Киселеву.

Константин КИСЕЛЕВ: Сергей Владимирович, в минувшем году в Российской Федерации началась реализация постановления Правительства России № 220 – это открытый конкурс, направленный на создание в высших учебных заведениях научных подразделений под руководством ученых мирового класса. Поскольку финансовое обеспечение этого конкурса является значительным даже в сравнении с конкурсами, проходящими в научно развитых странах мира, внимание научной общественности к нему столь же велико.

В 2010 году Минобрнауки России провело первый этап конкурса, были названы 40 победителей. Не все достойные ученые смогли в рамках прошлогоднего отбора получить гранты, но они могут принять участие во втором этапе, который пройдет в текущем году.

Давайте освежим в памяти читателей 2010 год и коснемся тех проблем, которые возникли в ходе реализации конкурса.

Сергей ИВАНЕЦ:

Действительно, этот конкурс для российского сектора исследований и разработок и высшего профессионального образования

беспрецедентен как по масштабам решаемых задач, так и по тем суммам, которые выделяет федеральный бюджет. Участниками стали ученые, среди которых много признанных на мировом уровне научных лидеров. Для нас главным при организации конкурса было стремление сделать его максимально открытым и прозрачным. Я надеюсь, что в значительной мере этого удалось добиться, так как мы использовали систему оценки и отбора заявок, основанную на высококачественной экспертизе с привлечением значительного количества российских и иностранных экспертов – ученых мирового уровня. Конечно, были и критические замечания, предложения по улучшению условий проведения конкурса, ряд которых мы сможем учесть при проведении конкурса в 2011 году.

Мы удовлетворены итогами конкурса 2010 года.

Какова цель данного конкурса? На какие результаты он ориентирован?

Это мероприятие – одно из комплекса организационных мероприятий, которые с 2008 года финансирует Правительство России с целью модернизации высшего образования. Другие основные

компоненты этого комплекса вам уже известны: конкурс инновационных программ развития вузов в рамках приоритетного нацпроекта «Образование», становление федеральных и национальных исследовательских университетов, развитие инновационной инфраструктуры в вузах.

Мы считаем, что образование в современных условиях только тогда может быть конкурентоспособным, если оно сочетается с исследовательской деятельностью. Необходимо такого рода деятельность усиливать (финансово подкреплять). С этой целью в 2009 году среди российских вузов был проведен конкурс и выявлены победители, которые стали национальными исследовательскими университетами. Следующий этап – не просто стимулирование университетских исследователей, но и привлечение лучших зарубежных исследователей. Такие ученые, во-первых, выполняют научный проект мирового уровня, во-вторых, создадут лабораторию, конкурентоспособную опять же на мировом уровне. Кроме того, произойдет усиление инфраструктурного обеспечения (приборы, оборудование, коммуникации). Для вуза появление в штате научной «звезды» – тот случай, с помощью которого можно обеспечить научный коллектив самыми передовыми знаниями и первоклассной практикой проведения исследовательской работы, подготовки публикаций.

Некоторые наблюдатели высказывали критические замечания: «Почему только вузы? Почему не научные организации, например, входящие в систему госакадемий?»

Речь не идет о том, что в вузах надо поддерживать исследования, а в научных организациях – нет. Данный конкурс целенаправленно входит в комплекс мер, направленных на подъем уровня исследова-



Сергей Иванец

дований в вузах и на обеспечение качества образования, конкурентоспособного в мире.

Для поддержки исследований в государственных академиях наук используются другие организационные и финансовые инструменты.

Вы сказали о привлечении для отбора и оценки заявок большого количества экспертов, в том числе зарубежных. Насколько эта работа была «непривычна» для Министерства?

В целом в Российской Федерации при проведении различных конкурсов в секторе исследований и разработок и в секторе высшего профессионального образования используется весьма представительная и широкая экспертная база. Но, действительно, в данном случае нам пришлось решать задачу по дополнительному привлечению большого количества международных специалистов для экспертизы на первом этапе конкурса. В некоторых случаях мы напрямую связывались с экс-

пертами, в других нам удалось договориться со специальными организациями, которые по роду своей деятельности занимаются тем, что организуют экспертизу исследовательских проектов. Таким образом, задача была решена, и теперь у нас имеются контакты и деловые отношения с этими экспертами. Мы уверены, что на втором этапе это нам существенно поможет.

Подчас и в самой совершенной экспертизе возникает конфликт интересов. Это неизбежная вещь, с ней Министерству пришлось каким-то образом бороться?

Да, такое случается: круг экспертов и исполнителей крупных международных проектов не является необъятным. В нашем случае эксперт дает обязательство, что в случае возможного конфликта интересов он сообщит об этом и в экспертизе определенного проекта участвовать не будет.

Конфликта интересов мы избегаем и за счет того, что у нас более половины экспертов – ино-

странцы, не имеющие непосредственных связей с российскими вузами. Кроме того, руководители экспертных групп внимательно следят за вопросами этики, потому что репутация в научном мире дороже тех гипотетических плюсов, которые можно получить за несправедливые баллы какому-то проекту.

География экспертизы широкая?

Да, география достаточно широкая и соответствует условиям конкурса. Все ключевые в научно-технологическом отношении страны охвачены: Соединенные Штаты Америки, Европейский Союз, частично Латинская Америка, целый ряд экспертов из Юго-Восточной Азии.

Президент России и Правительство Российской Федерации поддерживают идею привлечения зарубежных ученых и специалистов. Вопрос в том, что у людей, приезжающих к нам, особенно тех, которые привыкли к определенному формату существования общественных и социальных институтов, могут возникнуть проблемы приспособления к тем условиям, которые существуют у нас.

Если говорить только о бытовой стороне пребывания иностранного ученого в нашей стране, то здесь мы проблем не видим: сумма гранта достаточно велика, чтобы эти проблемы решить, тем более, когда иностранный ученый обязан интегрально (не обязательно единым куском) быть непосредственно в России 4 месяца в году.

Конечно, есть некоторые ограничения, которые могут создать определенные сложности, например, связанные с требованиями миграционного законодательства. Или, к примеру, сложности, связанные с пересечением границ биологическими образцами, реактивами. К сожалению, не могу сказать, что все решено. Вместе с тем

мы продвигаемся, и шаг за шагом эти проблемы решаются.

По поводу распоряжения деньгами. Есть ли какие-либо ограничения?

Фонд оплаты труда может составлять не более 60% от общей суммы гранта, это единственное ограничение. В остальном деньги могут быть потрачены на инфраструктуру, программы переподготовки специалистов, закупку реактивов и материалов. Ответственность за соответствие расходов требованиям контракта несет вуз, а все расходы осуществляются только с санкции руководителя проекта.

В прошлом году, поскольку конкурс фактически завершился в самом его конце, а заявки (в том числе на этапы расходования средств) представлялись намного раньше, мы сумели добиться разрешения для вузов и ученых-победителей конкурса на реформатирование заявок до заключения контракта. Это было сделано для того, чтобы на этапе, когда победители уже выявлены, им можно было перераспределить

эти средства на следующие периоды, чтобы их не потерять. Нам удалось решить этот достаточно сложный вопрос, который возник не по вине ученых.

Будет ли отличие второго этапа конкурса от первого?

Нам представляется очень важным, чтобы принципиальных отличий не было, поскольку конкурс – это единое целое. Участники первого этапа должны находиться в тех же условиях, что и участники второго.

Есть ли у вас опасения, что где-то произойдут осечки, и насколько велика будет их цена? Ведь могут быть разные комбинации, когда мы берем классного специалиста в вуз, который не смог создать нормальную среду. Или специалист не сумел собрать соответствующую команду. Или результаты окажутся не стоящими тех денег, которые будут затрачены.

Для эффективной реализации конкурса по его условиям часть финансирования направляется в организации-мониторы, отвечающие за контроль над проектом

на всех его этапах. Есть показатели и индикаторы, которые позволяют мониторам четко отслеживать, идут ли движения в том направлении, которое задано, или требуется корректировка.

В научной сфере существует много различных рисков, для минимизации которых должны приниматься меры. Мы считаем, что самой правильной мерой является международная экспертиза. При тех гарантиях, которые дает такая экспертиза, можно рассчитывать, что провалов быть не должно.

Когда вы планируете подвести итоги второго этапа?

Мы учли недочеты первого этапа: время на подготовку заявок увеличено до двух месяцев. Середина июня – завершение приема заявок. Дальше – экспертиза, после нее подведение итогов.

В этом году экспертиза у нас займет немного меньше времени, потому что в прошлом году мы параллельно вели подбор экспертов. Поэтому, я уверен, в этом году мы подведем итоги конкурса гораздо раньше. ●

Сотрудничество в области биомедицинских исследований между учеными США и России

В. Н. Даниленко

Учреждение Российской академии наук Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН,
119991, Москва, ул. Губкина, 3
E-mail: valerid@rutenia.ru

За последние два десятилетия десятки тысяч российских ученых, в том числе ведущие исследователи в области биомедицины, уехали работать в зарубежные страны. Часть ученых сохранила контакты с институтами РАН и РАМН, однако такие взаимодействия, как правило, являлись личной инициативой ученых. Сейчас ситуация с международным сотрудничеством стала меняться, и доказательство тому – прошедшая 25–26 апреля 2011 г. в Москве встреча представителей Национального института здоровья США (National Institute of Health, USA) и Российской академии наук.

ПРЕДЫСТОРИЯ ВОПРОСА

6 июля 2009 г. во время визита президента США Б. Обамы в Москву было провозглашено о создании двухсторонней российско-американской Президентской комиссии, которая должна содействовать укреплению связей, в том числе и научных, между Россией и США. В настоящее время в составе Комиссии функционирует 18 рабочих групп. Сотрудничеством по вопросам охраны здоровья населения России, США и, как декларируется в документе, «планеты в целом» занимается рабочая группа «Здравоохранение», возглавляемая министром здравоохранения и социального развития РФ Т.А. Голиковой и министром здравоохранения и социального обеспечения США К. Сибелиус. Заместитель руководителя рабочей группы – заместитель министра здравоохранения и социаль-

ного развития РФ В.И. Скворцова. Тогда же, в июле 2009 г., в Москве был подписан Меморандум о взаимопонимании между Министерством здравоохранения и социального обеспечения США и Министерством здравоохранения и социального развития Российской Федерации, в котором декларируется о сотрудничестве в области здравоохранения и медицинских наук.

22 сентября 2010 г. Фонд Национального института здоровья (Фонд НИИ) объявил о создании в рамках российско-американской двухсторонней Президентской комиссии российско-американского Форума в области медицинских наук для поддержки сотрудничества в области биомедицинских исследований. Форум инициирован Международным центром Фогарти Национального института здоровья США и предста-

вителями фармацевтического бизнеса США. Цель этого частно-государственного партнерства – развитие сотрудничества между учеными России и США в области контроля заболеваемости, лечения и профилактики, клинических и прикладных исследований, разработке новых медицинских технологий и создания инновационных лекарств.

По мнению организаторов, эта встреча должна способствовать установлению более тесных контактов между российскими и американскими правительственными учреждениями, а также учеными России и США. Деятельность Форума предполагает проведение ежегодных конференций для выработки стратегии совместных научных исследований, а также, по мнению организаторов, должна способствовать сокращению разрыва между проведением научных исследований и внедрением их результатов в практику. Важной задачей Форума является уточнение приоритетов исследований, формирование совместных исследовательских проектов, в том числе с привлечением фармбизнеса.

В июне 2010 г. представители Национального института здоровья США встретились с вице-президентом РАН академиком А.И. Григорьевым. Эта встреча положила начало научному диалогу о возобновлении сотрудничества. Во время визита президента РАН



Вице-президент РАН академик
А.И. Григорьев

академика Ю.С. Осипова в октябре 2010 г. в США руководство Национального института здоровья США выразило заинтересованность в установлении официального сотрудничества. Рабочие визиты в Национальный институт здоровья США ряда ведущих ученых России, академиков РАН В.В. Власова и М.В. Угрюмова, академиков РАМН Г.Т. Сухих и В.А. Тутельяна, члена-корр. С.В. Нетесова способствовали выработке платформы для сотрудничества.

Большая работа в этом направлении проводилась сформированными Программным и Организационным комитетами, в состав которых вошли крупнейшие ученые РАН, РАМН и МГУ им. М.В. Ломоносова.

РАБОЧЕЕ СОВЕЩАНИЕ ПО ПОДГОТОВКЕ ФОРУМА

Важным шагом по сближению научных сообществ двух стран стало Рабочее совещание, которое прошло 25–26 апре-

ля 2011 г. в Москве в Российской академии наук. Основная цель совещания – подготовка российско-американского Форума по сотрудничеству в области биомедицинских исследований. Организаторами выступили с российской стороны – Российская академия наук, Министерство здравоохранения и социального развития Российской Федерации, Российская академия медицинских наук, с американской стороны – Фонд Национального института здоровья, Национальный институт здоровья, Институт медицины Национальной академии наук США.

Сопредседателями Рабочего совещания были избраны вице-президент РАН академик Анатолий Иванович Григорьев и директор Международного центра Фогарти Национального института здоровья США доктор Роджер Гласс.

Заместитель председателя Рабочей группы по здравоохранению двухсторонней Президентской комиссии Россия–США, заместитель министра здравоохранения РФ В.И. Скворцова определила основные направления стратегии взаимодействия российских и американских ученых в рамках Форума. В своем докладе А.И. Григорьев осветил вопросы инфраструктурного обеспечения научных исследований в России, приоритеты биомедицинских исследований, а также подчеркнул роль фундаментальной науки как базы для инновационных разработок. Доктор Роджер Гласс представил доклад о структуре Национального института здоровья, о тематиках исследований и направлениях двухстороннего партнерства на начальном этапе деятельности Форума.

В Рабочем совещании приняли участие более 90 человек, крупнейшие ученые России и США и представители государствен-



Директор Международного центра Фогарти НИИ доктор Р. Гласс

ных органов. Высокий интерес к Совещанию проявило бизнес-сообщество – фармацевтические и биотехнологические компании Amgen, Amway, Bach Pharma, Becton Dickinson, Bristol-Myers Squibb, Boston Scientific, Coca-Cola, Eli Lilly, GalenBio, Genzyme, Johnson & Johnson, PepsiCo, Pfizer.

Для обсуждения на Совещании были отобраны следующие направления исследований: фундаментальная неврология; развитие организма и патология детского возраста; онкология; инфекции и эпидемиология; физиология и патология сердечно-сосудистой системы; здоровый образ жизни; трансляционная медицина. С обзором исследований, проводимых в России и США по выбранным направлениям, выступили академик М.В. Угрюмов (Науки о мозге), академик РАМН А.А. Баранов (Развитие человека), академик Г.П. Георгиев и д-р Тед Тримбл (Онкология), академик РАМН В.В. Зверев и д-р Роберт

Фонтейн (Инфекционные заболевания и эпидемиология), академик В.А. Ткачук и д-р Сьюзан Шурин (Сердечно-сосудистые заболевания), академик РАМН В.А. Тутельян и д-р Ван Хуббард (Здоровый образ жизни), академик РАМН Г.Т. Сухих (Клинические и трансляционные исследования). Отдельная секция была посвящена бизнесу, где было представлено 12 докладов как по фундаментальной науке, так и по прикладным клиническим и трансляционным исследованиям. В выступлениях представителей бизнес-сообщества прозвучали предложения к сотрудничеству и совместному участию в формировании и продвижении совместных проектов.

Американская делегация посетила Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Институт биологии гена РАН, Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова (факультет фундаментальной медицины), Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Кардиологический научный центр МЗСР, Научный центр здоровья детей РАМН, НИИ питания РАМН. Во время этих встреч участники обсудили конкретные вопросы научного партнерства.

При подведении итогов сопредседатели совещания сформулировали рекомендации по развитию структуры Форума и определили важнейшие этапы работы.

На начальном этапе сотрудничества планируется определить приоритетные проекты, представляющие взаимный интерес, а также ведущие научно-исследовательские учреждения и группы обеих стран, привлечь партнеров из неправительствен-

ных организаций и частного сектора. К сотрудничеству планируется активно привлекать другие правительственные учреждения и неправительственные организации, включая Фонд Национального института здоровья, Агентство США по международному развитию и организации частного сектора.

В результате планируется создание двухстороннего рабочего комитета, в который должны войти представители организаций с российской и американской сторон, а также бизнес-партнеры. Комитет разработает критерии отбора проектов и партнеров, условия финансирования проектов и проследит выполнение календарного плана по подготовке конференции Форума в ноябре 2011 г. в Москве.

ПОДПИСАНИЕ МЕМОРАНДУМА МЕЖДУ РАН И НИЗ

26 апреля 2011 г. в Москве, в старом здании Президиума РАН, уже начавшееся научное сотрудничество было оформлено официально подписанием Меморандума о сотрудничестве в области фун-

даментальных биомедицинских исследований между Российской академией наук и Национальным институтом здоровья США.

С российской стороны в подписании участвовали вице-президент РАН академик А.И. Григорьев, вице-президент РАН академик А.Ф. Андреев, Советник президента РАН по внешнеэкономическим связям академик М.В. Угрюмов, зам. начальника Управления внешних связей РАН В.В. Шаповаленко, ученый секретарь Совета при Президиуме РАН «Медицинская техника, технология и фармацевтика» проф. В.Н. Даниленко, представитель Управления внешних связей РАН Ю.К. Шиян.

От американской делегации в подписании Меморандума участвовали директор Международного центра Фогарти Р. Гласс, президент Офиса глобального здравоохранения Министерства здравоохранения и социального обеспечения США Н. Долейр, президент Института медицины Национальной академии наук США Х. Файнберг, директор Национального института сердца, легких



Подписание Меморандума

и крови США С. Шурин, директор Фонда Национального института здоровья США С. Кэмпбелл, профессор Института медицины Г. Кэсслл, зам. главы миссии США в России М. Митман, координатор Международного центра Фогарти М. Левинтова.

Этим документом после 12-летнего перерыва было восстановлено официальное сотрудничество между двумя крупнейшими научными организациями России и США в области биомедицинских исследований.

В Меморандуме очерчен круг приоритетных направлений сотрудничества на начальном этапе, включающий онкологические, сердечно-сосудистые, неврологические и инфекционные заболевания, инновационную фармацевтику, трансляционные исследования, биобезопасность, здоровье крупных групп населения (мегаполисы, стрессовые ситуации, географические особенности). Предполагается, что приоритетные направления сотрудничества могут по мере необходимости корректироваться.

ПЛАНИРУЕМЫЙ ФОРУМ В НОЯБРЕ 2011 Г.

В ноябре 2011 г. в Москве состоится конференция в рамках российско-американского научного форума «Биомедицинские и биосоциальные исследования» (U.S.-Russia Scientific Forum for Biomedical and Behavioral Research). В настоящее время формируется оргкомитет Форума. Он будет включать представителей Российской академии наук, Минздравсоцразвития РФ, Российской академии медицинских наук, Национального института здоровья США, Института медицины Национальной академии наук США, а также частных компаний.

Фонд НИИ открыл прием заявок от организаций и компаний – участников Форума. Условия участия и форма заявки приведены на сайтах <http://www.medtechpharm-ras.ru> (на русском языке) и <http://www.fnihorg/work/programs-development/us-russia-scientific-forum> (на английском языке). Наиболее перспективные проекты и предложения будут отобраны для участия

в Форуме. Предложения для Форума могут включать заявки на научные конференции, программы по обмену учеными, исследовательские проекты, образовательные программы и курсы повышения квалификации.

Платформа для партнерского сотрудничества ученых России и США готова, но всегда важен человеческий фактор, нужны лидеры, желающие и способные его организовать. Как отмечали многие участники Совещания, большой вклад в организацию сотрудничества внесла профессор Гейл Кэсслл, более 10 лет посвятившая совместной с российскими учеными работе в области изучения и лечения туберкулеза. Важно, что крупнейшие фармкомпании мира проявили заинтересованность в формировании совместных российско-американских проектов. Медико-биологическая наука в любой стране может развиваться, только если она востребована государством, промышленностью и медициной, призванными обеспечить здоровье населения страны. ●

Подписка на 2011 год Скидка 10%

+7 495 930-88-06

Подробности на сайте: www.actanaturae.ru

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ПАРАМЕТРЫ СТЕЙКИНГ-ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

Среди различных типов контактов в биомолекулярных комплексах (водородные связи, электростатические взаимодействия и др.) стейкинг ароматических фрагментов заслуживает особого внимания. Большинство лекарственных препаратов содержат ароматические циклы, и стейкинг часто играет важную роль в молекулярном узнавании рецептор-лиганд. Ранее мы показали [5], что полный учет стейкинг-взаимодействий существенно повышает эффективность дозирования АТФ. Стейкинг-контакты описывали функцией, зависящей от геометрических параметров взаимного расположения двух ароматических фрагментов – высоты h и угла α между штири и сдвига d одного из колец относительно другого (рис. 1).

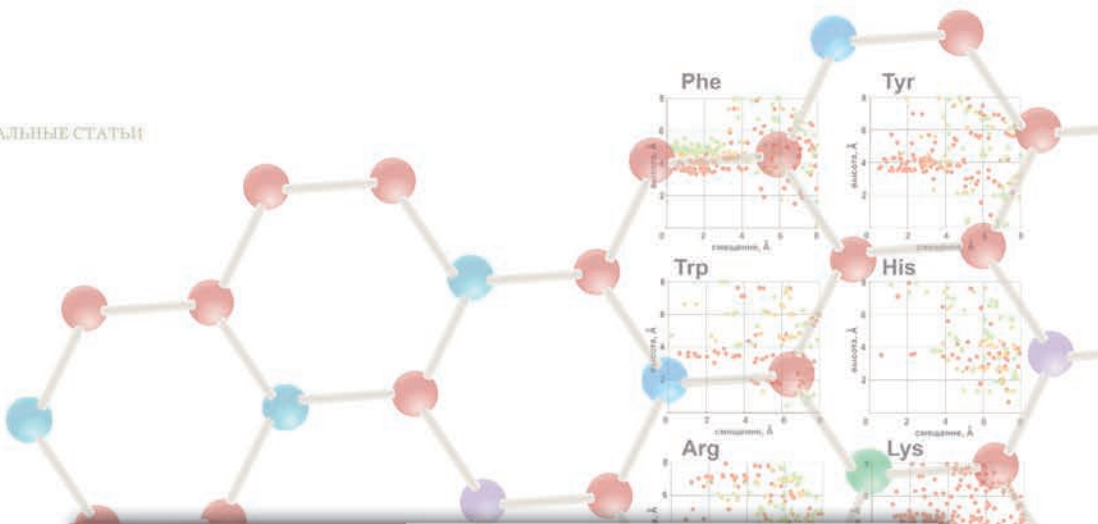
Динамикой этих параметров, определяющей наличие или отсутствие стейкинга, до сих пор остается не выясненным и в оценочных критериях выбирается достаточно произвольно [6, 7]. Его уточнение могло бы повысить эффективность оценки качества и достоверности структур белков-лиганд, представляемых методами молекулярного моделирования. С этой целью мы провели анализ экспериментально установленных пространственных структур атомного разрешения для комплексов различных белков с лигандами, содержащими наиболее распространенные пуриновые основания – аденин и гуанин.

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

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

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

Рис. 1. Геометрические параметры, с помощью которых описывают стейкинг-взаимодействие между двумя ароматическими кольцами: сдвиг d и высота h (а) центра одного из колец относительно другого; угол α между нормальными к плоскостям колец.



АПРЕЛЬ-ИЮНЬ 2009 № 1

ActaNaturae

НЕПРИРОДНЫЕ АНТИТЕЛА
ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

РЕГУЛЯЦИЯ ТЕЛОМЕРАЗЫ В ОНКОГЕНЕЗЕ
СТР. 5

СТРУКТУРА МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА ВОЗБУДИТЕЛЯ ОПИСТОРХОЗА
СТР. 39

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

УДК 577.2

Промоторы со специфической активностью в раковых клетках при генной терапии меланомы

В. В. Плешкан^{1,2*}, И. В. Алексеенко^{1,2}, М. В. Зиновьева¹, Т. В. Виноградова¹, Е. Д. Свердлов^{1,2}¹Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10²Учреждение Российской академии наук Институт молекулярной генетики РАН, 123182, Москва, площадь Академика И.В. Курчатова, 2

E-mail: vpleshkan@gmail.com

Поступила в редакцию 01.04.2011 г.

РЕФЕРАТ Меланома – злокачественная опухоль, развивающаяся из пигментообразующих клеток меланоцитов, – относится к наиболее агрессивным формам рака. Использование генетических конструкций, специфически убивающих клетки меланомы, не затрагивая здоровые клетки, могло бы продлить время жизни больных и улучшить качество их жизни. Один из способов достижения избирательности действия терапевтических генов по отношению к опухолевым клеткам – использование для стимуляции транскрипции терапевтического гена промоторов, активных только в опухолевых, но не в нормальных клетках. В представленном обзоре описаны промоторы генов, экспрессирующихся преимущественно в клетках меланомы. Использование таких строго специфических к опухоли этого вида промоторов и регуляторных элементов позволяет снизить вероятность неспецифической экспрессии генов в нормальных тканях. В то же время при создании универсальных противоопухолевых средств преимущество имеют опухолеспецифические промоторы и их регуляторные элементы. В обзоре приведены примеры использования двойных промоторов, имеющих большие перспективы для генной терапии опухолей.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА меланома, генная терапия, тканеспецифические промоторы, специфическая экспрессия трансгена.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ Ad – аденовирус; CRAds (conditionally replicative adenoviruses) – условно реплицирующиеся аденовирусы; DT-A – А-цепь дифтерийного токсина; HSVtk – тимидинкиназа вируса простого герпеса; МРЛ – мелкоклеточный рак легкого; MC1R (melanocortin 1 receptor) – рецептор 1 меланокортина; MIA (melanoma inhibitory activity) – белок меланомной ингибирующей активности; MITF (microphthalmia-associated transcription factor) – фактор транскрипции, ассоциированный с микрофтальмией; TERT – обратная транскриптаза теломеразы человека; TSP (tumor specific promoter) – опухолеспецифический промотор; TSS (transcription start site) – точка начала транскрипции.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы во всем мире, в том числе и в России, отмечается неуклонный рост заболеваемости злокачественной меланомой кожи. Злокачественная меланома относится к наиболее агрессивным опухолям, пятилетняя выживаемость больных не превышает 50%. Особенность меланомы заключается в раннем метастазировании, поэтому химио- и лучевая терапии малоэффективны при этом заболевании [1–3].

В перспективе важное место в терапии злокачественной меланомы отводится методам генотерапии, основанным на введении терапевтического гена (трансгена) в меланомные клетки больного. Терапев-

тические конструкции могут содержать гены, компенсирующие снижение экспрессии генов-супрессоров, которое приводит к развитию опухоли, или, наоборот, гены, продукты которых нейтрализуют повышенную экспрессию нежелательного гена (онкогена) [4–7]. Среди генных стратегий уничтожения раковых клеток одним из наиболее универсальных считается подход, в котором используются так называемые гены-убийцы [8–10]. При этом в опухолевую клетку вводится ген, кодирующий фермент, несвойственный нормальной клетке и способный превращать нетоксичное для здоровых клеток соединение (пролекарство) в токсин, вызывающий гибель опухолевых клеток, содержащих ген-убийцу. Таким образом, обе-

спечивается селективное уничтожение раковых клеток, в которых работает ген-убийца [11–13]. Наиболее известными и используемыми генами-убийцами служат ген тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSVtk) и ген цитозиндезаминазы дрожжей (FCY1). В отличие от клеточной тимидинкиназы, HSVtk обладает способностью фосфорилировать противогерпетические средства ацикловир и ганцикловир. Клетки, трансформированные геном HSVtk, погибают в присутствии этих агентов, поскольку клеточные киназы превращают фосфорилированные ацикловир и ганцикловир в трифосфаты, которые при клеточном делении включаются во вновь синтезированную ДНК и обрывают дальнейший ее синтез. При этом погибают именно делящиеся клетки, а не покоящиеся, в которых не синтезируется ДНК и не включается ганцикловир или ацикловир [14]. Ген HSVtk успешно использовали в экспериментальной терапии многих видов опухолей у животных. Ряд систем с использованием этого гена проходит клинические испытания [13, 15, 16]. Использование гена FCY1 основано на отсутствии его продукта – цитозиндезаминазы – в клетках млекопитающих и на его способности превращать нетоксичный для человека 5-фторцитозин в известный цитостатик – 5-фторурацил [17, 18]. После внедрения цитозиндезаминазы в опухолевые клетки и ее специфической экспрессии в них введение в организм больного фторцитозина приводит к его внутриклеточному превращению во фторурацил, что снижает токсический эффект фторурацила на нормальные клетки.

Специфичность вектора к ткани данного типа может задаваться либо путем его доставки именно в эту ткань, либо путем создания условий для специфической экспрессии трансгена в заданной ткани. Последний метод ввиду его простоты используется чаще. С этой целью в конструкции векторов используют промоторы и энхансеры, работающие специфично в опухолях данной ткани [19, 20]. В случае злокачественной меланомы используют промоторы и энхансеры генов, вовлеченных в биосинтез меланина. Преимуществом строго специфических к опухолям данного типа промоторов и других регуляторных элементов является обеспечение экспрессии трансгена только в опухолевых, но не в нормальных тканях. Однако недостатком таких подходов является их не-универсальность и связанное с этим неизбежное увеличение стоимости препаратов, основанных на таких промоторах. Компромиссный вариант состоит в использовании более универсальных опухолеспецифических промоторов, способных работать в широком спектре опухолей, но не в нормальных клетках. Несколькими увеличивая риск поражения нормальных тканей, такой подход считается экономически более

оправданным: одни и те же конструкции могут использоваться в терапии широкого спектра опухолей. Существует и еще одно соображение в пользу промоторов более широкого спектра действия. Оно связано с плохо изученной специфичностью экспрессии генов в метастазах данной опухоли. Нет строгой гарантии, что узкоспецифический промотор, хорошо работающий в первичной опухоли, сохранит эту способность во всех ее метастазах. Использование универсальных промоторов снижает вероятность инактивации промотора в метастазах.

В представленном обзоре описаны структура и свойства как промоторов, специфических для клеток меланомы, так и промоторов, активных в широком спектре опухолей, но, тем не менее, используемых в генной терапии меланомы.

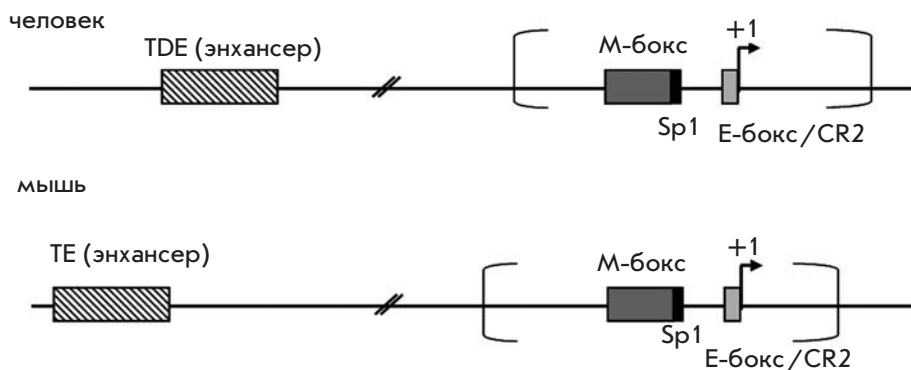
ПРОМОТОРЫ, СПЕЦИФИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ В МЕЛАНОЦИТАХ

Наиболее изученные и используемые в настоящее время промоторные модули, контролирующие специфическую экспрессию терапевтического гена в клетках меланомы, – промоторы генов тирозиназы (TYR) или меланомной ингибирующей активности (MIA), иногда в сочетании с дистальными элементами других промоторов и/или энхансерами [21, 22].

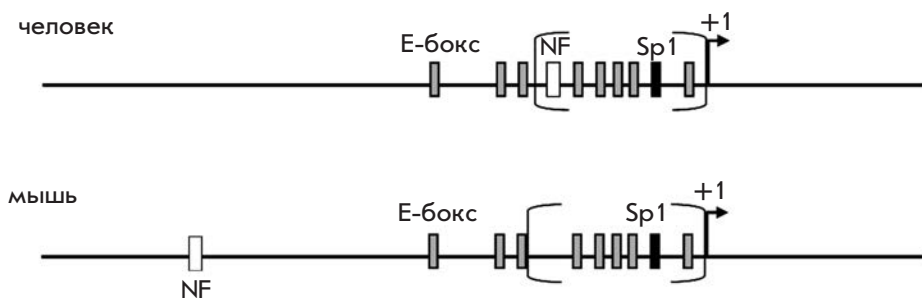
Промотор гена тирозиназы

Тирозиназа (TYR) – один из ключевых ферментов, необходимых для синтеза пигмента меланина, который образуется только в меланоцитах и пигментном эпителии сетчатки. Ген TYR экспрессируется исключительно в указанных клетках и во многих – но не во всех – меланомах человека и служит хорошим маркером дифференцировки меланоцитов [23]. Показано, что 5'-область относительно точки инициации транскрипции (transcription start site, TSS) определяет специфичность экспрессии гена тирозиназы [24, 25]. Делеционный анализ показал, что минимальный промотор гена тирозиназы человека, по-видимому, находится в координатах -209/+51 относительно TSS [26] (рис. А). Для тканеспецифической активности промотора TYR человека достаточно фрагмента 115 п.н. [24]. Этот фрагмент промотора содержит три позитивных регуляторных элемента: консервативный элемент, характерный для меланоцит-специфических промоторов – М-бокс (-104/-37 от TSS), соединенный с девятью нуклеотидами, названными CR1, Sp1-сайт (-45/-37 от TSS), и эволюционно консервативный элемент CR2, состоящий из мотива Е-бокса и перекрывающегося с ним октамерного элемента (-14/+1 от TSS) [24]. Характерно, что октамерный элемент в промоторе TYR выроден у многих млекопитающих, включая мышь

А Промотор гена тирозиназы



Б Промотор гена MIA



Схематическое изображение структуры промоторов генов тирозиназы и меланомной ингибирующей активности (MIA) человека и мыши. А – Схема промотора гена тирозиназы; Б – схема промотора MIA. Прямоугольником с косой штриховкой обозначен энхансер, белым прямоугольником – сайт связывания фактора транскрипции NF-κB; темно-серым прямоугольником – M-бокс, светло-серым – E-бокс, черным – сайт связывания фактора Sp1; круглыми скобками выделен участок, соответствующий минимальному промотору. Стрелкой указан сайт инициации транскрипции.

[27]. E-бокс содержит мотив CANNTG, связывающий факторы транскрипции семейства bHLH (basic-helix-loop-helix). Этот мотив обнаружен в промоторах гена TYR у разных видов животных, подобный мотив входит и в состав M-бокса, а также в энхансерный участок гена тирозиназы [27]. Меланоцит-специфическая экспрессия гена тирозиназы активируется при связывании продукта гена MITF с участком промотора, включающего M-бокс и начало E-бокса [24].

Промоторы генов тирозиназы человека и мыши обладают высокой степенью идентичности нуклеотидной последовательности [25]. Однако функциональное сравнение промоторов этих генов человека и мыши показало, что промотор TYR человека проявлял меньшую эффективность и специфичность экспрессии в меланоцитах, чем промотор Tyr мыши [25]. Предполагается, что в активности промотора TYR человека большую роль играет энхансер. Энхансер TYR человека, названный тирозиназным дистальным элементом (TDE), расположен в координатах -2014/-1810 и содержит E-бокс [25]. Для проявления специфической активности гена тирозиназы человека важно связывание двух факторов транскрипции MITF с E-боксами, входящими в состав как промотора, так и энхансера [21].

В 5'-области гена тирозиназы мыши также обнаружен энхансер размером 200 п.н., идентичный энхансеру TYR человека, однако, для проявления специфической активности гена мыши важен только промотор [26, 28].

Промотор гена меланомной ингибирующей активности (MIA)

Ген меланомной ингибирующей активности (MIA) экспрессируется преимущественно в клетках меланомы, хондросаркомы, в некоторых аденокарциномах и хондроцитах, но при этом он не активен в нормальных меланоцитах [29–31]. Белок MIA – секретлируемый ингибитор клеточного роста, который препятствует присоединению клеток меланомы к внеклеточному матриксу, тем самым способствуя инвазии и метастазированию [32–34]. В отличие от промотора гена TYR, активность промотора гена MIA человека коррелирует с прогрессией меланомы [35]. Известно, что участок длиной 1.4 т.п.н., фланкирующий 5'-участок гена MIA относительно точки инициации транскрипции, обеспечивает специфичность экспрессии этого гена только в меланомных клетках, но не в меланоцитах [36]. С помощью делеционного анализа показано, что минимальный промотор

гена *MIA* человека состоит из 212 п.н. (координаты -211/+1), мыши – 230 п.н. (-229/+1), как это показано на рис. Б. При этом элементы промоторов этого гена человека и мыши, ответственные за специфичность экспрессии в клетках меланомы, расположены в координатах -212/-170 и -230/-130 соответственно [36, 37]. Структура и размер промоторов *MIA* у человека и мыши консервативны и содержат одинаковые элементы, которые могут различаться своим положением [38]. Так, оба промотора *MIA* не содержат ТАТА-боксы и/или СААТ-последовательность вблизи точки инициации транскрипции. Сайт Sp1 консервативен, он находится в положении -108/-103 в промоторе *MIA* человека и -106/-101 в промоторе мыши. Промоторы *MIA* содержат множественные E-боксы с сайтами связывания мотивов типа «спираль-петля-спираль» (bHLH-binding motif) [36] (рис. Б). Сайт связывания фактора транскрипции NF-κB также высококонсервативен в генах человека и мыши, но при этом имеет разные координаты (-207/-198 и -819/-811 соответственно) [36]. Делеция или мутация этого сайта приводит к значительному снижению активности промотора *MIA* человека в клетках меланомных линий [36]. Промоторы *MIA* человека и мыши включают и такие распространенные элементы, как сайты связывания α-INF-2, C/EBP, GATA-1, GM-CSF, NF-IL6, NF-κB, TCF-2 и другие. Интересно, что активность промотора *MIA* может зависеть от фактора NF-κB, контролирующего экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла [36]. Об энхансерных элементах гена *MIA* до настоящего времени ничего не известно.

Промотор гена рецептора меланокортина

Рецептор MC1R (рецептор 1 меланокортина) экспрессируется преимущественно в меланоцитах и меланомах [39, 40]. MC1R представляет собой сопряженный с G-белком трансмембранный рецептор α-меланоцитстимулирующего гормона (α-МСГ). Высокая экспрессия гена *MC1R* характерна также для клеточных линий, происходящих из первичных и метастатических меланом [41]. Минорные количества этого рецептора встречаются и в других тканях и клетках, например в яичке, яичнике, надпочечниках, кератиноцитах, дендритных клетках и активированных моноцитах [41, 42]. Участок длиной 3.2 т.п.н., расположенный в 5'-области относительно TSS гена *MC1R*, содержит несколько Sp1-связывающих мотивов, консенсусные последовательности AP-1- и AP-2-сайтов и несколько E-боксов. Промотор гена *MC1R* не содержит ТАТА- и СААТ-последовательностей вблизи TSS [43, 44]. Меланоцит-специфическая экспрессия *MC1R*, как и гена тирозиназы, активируется при связывании фактора транскрипции MITF

с E-боксом [45–48]. Показано, что 150 п.н., расположенных выше АТГ-кодона гена *MC1R*, достаточно для инициации меланоцит-специфической транскрипции [49]. Этот минимальный промотор может рассматриваться как один из возможных кандидатов, вовлеченных в транскрипционный контроль экспрессии трансгена в клетках меланомы.

Использование гетерологичных регуляторных элементов для усиления промоторов меланомы

Использование контролирующих транскрипцию *cis*-регуляторных элементов на основе различных сочетаний промотора гена тирозиназы и дополнительных гетерологичных энхансеров для специфической экспрессии трансгена в меланоме описано в ряде работ [21, 22, 26]. Оказалось, что только в присутствии энхансерного элемента промотор *Tyr* обеспечивает высокую активность и специфичность гена *Tyr* человека [25]. Конструкция, состоящая из промотора *Tyr* человека (209 п.н.) и двух и более последовательно присоединенных энхансеров *Tyr* человека (по 200 п.н. каждый), проявляет наибольший специфический эффект при трансфекции клеток меланомных линий [26]. Димер энхансера гена тирозиназы мыши, соединенный с промотором гена мыши, также усиливает активность и специфичность гена мыши [26]. Подобные конструкции использовали при создании условно реплицирующихся аденовирусов (CRAds), где промотор аденовирусного гена *E1A* заменяли специфически активным в меланомах промотором hTyr2E/P, состоящим из димера энхансера гена тирозиназы человека и корового промотора этого гена человека [50]. Полученные аденовирусы проявляли выраженное онколитическое действие на клетки меланомных линий. Цитотоксический эффект таких конструкций был сравним по уровню с действием CRAd с сильным неспецифическим цитомегаловирусным (CMV) промотором. В то же время наблюдалось сильное снижение цитотоксического эффекта аденовируса на нормальные фибробласты и кератиноциты [50]. Таким образом, использование специфического промотора в области *E1A* генома аденовируса позволило добиться селективного воздействия на клетки меланомы. Еще больший эффект на активность и специфичность промотора *Tyr* человека оказывало присоединение нескольких энхансеров гена тирозиназы мыши. Так, например, при создании онколитических аденовирусных векторов использовали промоторную конструкцию TETP, которая содержала коровый промотор *Tyr* человека (tyrosinase promoter – TP) и тандем из четырех энхансеров гена тирозиназы мыши (tyrosinase enhancer – TE) [51]. Использование этого промотора для контроля экспрессии гена-

репортера люциферазы повышало активность последнего в клетках меланомы на несколько порядков по сравнению с активностью в немеланомных клетках [51]. Замена энхансеров мыши на энхансерные последовательности человека в данных конструкциях приводила к повышению активности репортерного гена только в 2–3 раза [51]. Этот же промотор (TETP) использовали для контроля экспрессии суицидных генов, доставляемых в клетки меланомы с помощью бактерий *Listeria monocytogenes* [52]. Ранее было показано, что невирулентные штаммы листерий могут проникать в клетки солидных опухолей и обеспечивать в них репликацию доставляемых плазмид [53–55]. При бактериальной доставке плазмид, в которых промотор TETP контролирует суицидный ген пурин-нуклеозидфосфорилазы (PNP) или химерный ген цитозиндезаминазы и фосфорибозилтрансферазы (FCU1) дрожжей, трансген специфически экспрессируется в клетках меланомы B16, но не в фибробластах почки COS-1. Если используется неспецифический CMV-промотор, то суицидные гены экспрессируются в обеих линиях клеток [52].

Еще одним примером использования гетерологичных регуляторных элементов для усиления промотора *TYR* может служить промотор *Tyrex2*, содержащий коровий промотор *TYR* человека и тандем из двух энхансеров гена тирозиназы мыши [56]. При создании аденовирусного вектора этот промотор использовали для контроля работы суицидного гена *PNP*, способного превращать пролекарство 6-метилпуриндезоксирибонуклеозид в высокотоксичное пуриновое основание 6-метилпурин [57]. При обработке клеток меланомы аденовирусом *Tyrex2*-*PNP* и внесения пролекарства погибало около 90% клеток. В немеланомных клеточных линиях, цитотоксический эффект наблюдался только при использовании неспецифического конститутивного CMV-промотора [56].

С использованием репортерного гена хлорамфениколацетилтрансферазы (CAT) и терапевтических генов *HSVtk* и *DT-A* (A-цепь дифтерийного токсина) сравнили активность промоторов генов *Tyr* мыши и *MIA* человека и их сочетаний с одним или несколькими энхансерами гена тирозиназы мыши [22]. Промоторы генов *Tyr*, *MIA* и их различные сочетания с энхансерами гена тирозиназы мыши обеспечивали специфическую экспрессию как репортерного гена CAT, так и терапевтических генов *HSVtk* и *DT-A* в клетках линий меланомы. Показано, что присоединение нескольких энхансеров гена тирозиназы к промотору *MIA* значительно повышает специфическую активность промотора *MIA* в клетках меланомных линий, причем, как и в случае промотора гена ти-

розиназы, эффект от энхансеров мыши на порядок выше, чем от энхансеров *TYR* человека. Наибольший эффект в обоих случаях наблюдался при использовании конструкций, содержащих одновременно три-четыре энхансера мыши [22].

Описан рекомбинантный аденоассоциированный вектор, в котором использован суицидный ген под промотором *MIA*, соединенным с тандемом из четырех энхансерных элементов гена тирозиназы мыши [58]. Изучены конструкции с полноразмерным промотором *MIA* (1386 п.н.) и минимальным промотором *MIA* (493 п.н.), достаточным для поддержания специфической транскрипции в клетках меланомы (рис. Б). Показано, что конструкции, содержащие только промоторы *MIA*, имели слабую транскрипционную активность, добавление тандема из четырех энхансеров гена тирозиназы мыши значительно увеличивало специфическую активность только в клетках меланомных линий [58]. Транскрипционный потенциал конструкции с энхансерами гена тирозиназы и минимальным промотором *MIA* был немного ниже, чем у конструкции с полным промотором. Эффект ингибирования роста клеток меланомы при использовании промоторов *MIA* с четырьмя энхансерами гена тирозиназы лишь немного уступает эффекту конструкции с CMV-промотором, который, однако, не обеспечивает избирательности экспрессии трансгена [58].

Приведенные результаты показывают, что использование различных сочетаний меланомоспецифических промоторов и энхансеров обеспечивает высокий уровень экспрессии трансгенов в клетках меланомы и может решать проблему специфичности при генотерапии данного заболевания [50, 52, 56]. Особый интерес представляет промотор гена *MIA*, так как этот ген, в отличие от гена *TYR*, экспрессируется только в клетках злокачественной меланомы, но не в других клетках меланоцитарного ряда. Таким образом, регуляторные элементы этого гена могут сочетать как тканеспецифические, так и опухолеспецифические свойства. Однако до настоящего времени промотор гена *MIA* мало изучен в качестве кандидата для генной терапии меланомы и практически ничего не известно о возможностях промотора гена *MC1R*.

ПРОМОТОРЫ, СПЕЦИФИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ В КЛЕТКАХ МЕЛАНОМЫ И ДРУГИХ ОПУХОЛЕЙ

Другой подход, позволяющий специфически контролировать экспрессию трансгена в клетках меланомы, – использование промоторов, специфических не только для меланомы, но и других опухолевых клеток – TSP (tumor specific promoter). Примерами TSP-промоторов являются промоторы генов *TERT*, *Sox-2*, *CXCR4* и *BIRC5*, для которых характерна

сверхэкспрессия контролируемых ими генов во многих типах опухолей и отсутствие или минимальная экспрессия в нормальных тканях.

Ген *TERT* кодирует каталитическую субъединицу теломеразы человека. Этот ген активен во время эмбрионального развития, а также в опухолевых клетках (примерно в 85% случаев), тогда как в подавляющем большинстве нормальных клеток организма экспрессия *TERT* подавлена [59]. Экспрессия *TERT* повышена при поверхностно распространяющейся меланоме [60], что, как предполагается, защищает клетки меланомы от вхождения в апоптоз.

Циклооксигеназа 2 (*Coх-2*) – это индуцибельная изоформа *Coх-1*, которая, в отличие от *Coх-1*, не детектируется в большинстве нормальных тканей [61]. Экспрессия гена *Coх-2* тесно связана с канцерогенезом и прогрессией некоторых типов интестинальных неоплазий и опухолей эпителиального происхождения [62, 63]. Ген *Coх-2* экспрессируется на высоком уровне в клетках меланомы и не экспрессируется в родинках и нормальном эпителии гена [64].

Экспрессия гена *CDF-1* рецептора α -хемокина – *CXCR4* – характерна для клеток рака молочной железы и практически не детектируется в нормальном эпителии молочной железы [65]. Сверхэкспрессия рецепторов *CXCR3* и *CXCR4* показана и в клетках меланомы. Предполагается, что рецепторы играют важную роль при инвазии меланомы, модулируя клеточную подвижность, пролиферацию и выживание [66].

Сурвивин, кодируемый геном *BIRC5*, относится к белкам-ингибиторам апоптоза, он играет важную роль в росте и прогрессии опухолей различного типа [67]. *BIRC5* экспрессируется в эмбриональных и фетальных тканях [68], многих типах неоплазий, включая меланому [69–71], и не детектируется в дифференцированных взрослых тканях [72].

Опухолеспецифические промоторы могут использоваться в составе описанных выше условно реплицирующихся аденовирусов (CRAds) для достижения онколитического эффекта. Так, промотор *TERT* использовали вместо промотора гена *E1A* для транскрипционного контроля репликации аденовируса. Кроме того, эта конструкция содержала ген апоптина под сильным конститутивным CMV-промотором [73]. Апоптин – вирусный белок, который специфическим образом индуцирует апоптоз раковых клеток [74]. Таким образом, создана система, обладающая «двойной» опухолеспецифичностью – определяемой промотором *TERT*, который активируется в опухолевых клетках, и апоптином, избирательно воздействующим на опухолевые клетки. При инфицировании клеток вирусами Ad-*TERT*-*Aoptin* происходило подавление роста меланомных клеток линий A375

и B16, приводящее в итоге к апоптозу, в то время как нормальные эпидермальные меланоциты были защищены от подобного действия [73]. Более того, на модели метастатической меланомы мыши показано уменьшение легочных метастазов при внутриопухолевом и системном введении конструкции Ad-*TERT*-*Aoptin*. При использовании этой системы наблюдалось также увеличение выживаемости мышей [73].

Перспективность использования других опухолеспецифических промоторов в терапии меланомы оценили, определяя активность репортерного гена люциферазы, находящегося под транскрипционным контролем промоторов генов *Coх-2*, *CXCR4* и *BIRC5*. В качестве вектора использовали рекомбинантные аденовирусы, содержащие вместо *E1*-области один из TSP-промоторов и контролируемый им ген люциферазы [75]. Активность люциферазы измеряли в четырех клеточных линиях меланомы (Mel-624, A375M, SK-MEL-28 и MeWo) и в нормальных эпителиальных меланоцитах (HEM) [75]. Промотор гена *CXCR4* не обладал требуемой специфичностью – в нормальных меланоцитах его активность была даже выше, чем в клетках меланомы [75]. Ранее в меланомных клеточных линиях выявили транскрипционную активность промотора *Coх-2*, который не работал в первичных меланоцитах [76]. Однако активность промотора гена *Coх-2* сильно варьирует в зависимости от типа клеточных линий [75]. Наибольшую специфическую активность показал промотор гена сурвивина. Более того, его активность в нормальных меланоцитах была значительно ниже, чем в клетках меланомы [75]. Недавно показали, что при использовании промотора гена сурвивина для контроля экспрессии гена йодидного симпортера (*NIS*) клетки меланомной линии A375 приобретают способность поглощать радиоактивный йод-131, что отрицательно влияет на их выживание [77]. В то же время нормальные фибробласты зубной пульпы человека, трансфицированные этой же конструкцией, йод не поглощают и не погибают. Таким образом, из сравниваемых опухолеспецифических промоторов оптимальным для терапии меланомы был сурвивиновый промотор.

У большинства опухолеспецифических промоторов активность ниже, чем у конститутивных сильных промоторов, таких, как промоторы SV40 и CMV [75, 78, 79]. При этом активность даже сравнительно сильных опухолеспецифических промоторов значительно варьирует в зависимости от типа раковых клеток. В различных линиях опухолевых клеток активность промотора гена сурвивина варьирует от 0.3 до 16% от активности CMV-промотора [80–82], а эффективность работы промотора *TERT* может различаться до 20 раз [83].

Использование промоторов, обладающих определенной тканеспецифической активностью, позволяет решить множество проблем, связанных с неспецифической токсичностью вектора доставки. Так, аденовирусные векторы имеют существенные ограничения, обусловленные низкой эффективностью трансдукции клеток меланомы из-за малой концентрации или отсутствия на клетках меланомы коксаки-аденовирусных рецепторов (CAR), опосредующих трансдукцию клеток [84]. Введение высоких доз аденовирусов отрицательно сказывалось на организме в целом. Созданы конструкции AdRGD аденовирусов, обладающие тропизмом к α_v -интегринам и более эффективно трансдуцирующие клетки меланомы, нежели стандартные аденовирусы [85]. Тем не менее, системное введение таких аденовирусных конструкций приводило к неспецифической трансдукции и гибели нормальных клеток. Решением этой проблемы стало использование специфических промоторов. Перспективными для терапии меланомы оказались аденовирусы AdRGD, содержащие суицидный ген *HSVtk* под транскрипционным контролем опухолеспецифического промотора *TERT* или специфического для меланомы промотора Tyrex2 вместо стандартного неспецифического CMV-промотора [86]. При внутриопухолевом введении векторов AdRGD-TERT-HSVtk или AdRGD-Tyrex2-HSVtk отмечено уменьшение размеров опухоли у мышей после введения ганцикловира. Такой же эффект достигается при введении низких доз неспецифического AdRGD-CMV-HSVtk, однако в этом случае при повышении дозы вектора наблюдалась потеря веса у мыши и токсические повреждения печени [86]. С другой стороны, даже внутривенное введение высоких доз векторов AdRGD-TERT-HSVtk или AdRGD-Tyrex2-HSVtk не вызывает токсических повреждений печени. Таким образом, благодаря использованию специфических промоторов достигается супрессия неспецифической цитотоксичности аденовирусов в нормальных, не опухолевых клетках [86].

Для создания эффективных генно-терапевтических средств большое значение имеет размер промотора, поскольку многие векторы имеют ограниченную емкость. Показано, например, что у ретровирусных векторов, содержащих длинные промоторные модули, титр вируса зачастую снижается при увеличении размера введенного промотора [87]. Однако многие короткие промоторы либо очень слабы, либо теряют свою тканевую специфичность, поэтому возможность создания коротких и специфических промоторов, обладающих достаточным транскрипционным потенциалом, представляется важной задачей. Способом, позволяющим справиться с этими ограничениями,

может стать создание синтетических и/или двойных (химерных) промоторов.

СОЗДАНИЕ И ОПТИМИЗАЦИЯ СИНТЕТИЧЕСКИХ И ДВОЙНЫХ ПРОМОТОРОВ, ОБЛАДАЮЩИХ ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Для создания специфических промоторных модулей *de novo* используются охарактеризованные контролирующие элементы известных промоторов. Например, созданы искусственные промоторы на основе элементов промоторов генов тирозиназы и α -фетопротейна (AFP1) человека, обладающих сильной и специфической экспрессией в клеточных линиях меланомы [88]. Как отмечено ранее, промотор тирозиназы содержит M-бокс – консервативный элемент, характерный для меланоцит-специфических промоторов [89]. Этот элемент использовали в сочетании с элементами из 5'-области промотора *AFP1* – специфическим для клеточного цикла элементом GRE и AP1-связывающим элементом. При различных комбинациях одной или нескольких копий фрагментов промоторов тирозиназы и α -фетопротейна – M-бокса, AP1- и GRE-элементов, получены несколько эффективных меланоцит-специфических промоторов. Эти промоторы были селективно активны в меланомной линии B16, но не в клетках линии HeLa [88]. Длина искусственных конструкций не превышала 300 п.н., наиболее эффективным был промотор, состоящий из трех GRE-, трех AP1-элементов и двух M-боксов. Установлено, что если число регуляторных элементов промотора в химерной конструкции превышает восемь единиц, то наблюдается потеря специфичности промотора [88]. По-видимому, активность синтетических промоторов зависит как от числа регуляторных элементов, так и от вектора. Оптимальное число регуляторных элементов необходимо подбирать в каждом случае. Например, в описанной выше работе Ротфелса и соавт. [22] показано, что для увеличения активности промоторов как *MIA*, так и *TYR*, достаточно присоединить четыре копии энхансера гена тирозиназы мыши.

Другой подход к конструированию специфических промоторов состоит в создании химерных или двойных промоторов.

Как отмечалось выше, большинство опухолеспецифических промоторов обладают более низкой активностью, чем конститутивные сильные промоторы, такие, как промоторы вирусов SV40 и CMV. Одним из подходов, позволяющих решить проблемы эффективности опухолеспецифических промоторов, является использование гибридных двойных промоторов: (i) один из которых опухолеспецифический, тогда как другой – сильный неспецифический; (ii) каждый промотор опухолеспецифический. Описанные двой-

ные промоторы обладают более высокой активностью в опухолях определенного типа, чем природные.

В качестве примера первой конструкции можно привести химерный промотор CMV-hTERT [90]. Химерная конструкция была получена на основе промотора гена обратной транскриптазы теломеразы человека (hTERT) и минимального CMV-промотора, который обладает большей активностью, чем немодифицированный промотор *hTERT*, сохраняя при этом опухолеспецифичность.

Описаны также двойные опухолеспецифические промоторы [91, 92]. С целью повышения эффективности экспрессии терапевтических генов в клетках мелкоклеточного рака легкого (МРЛ) получен химерный двойной промотор на основе промоторов генов *hASH1* и *EZH2*, имеющих высокий уровень экспрессии в клетках МРЛ. Активность двойного химерного промотора превышала активности соответствующих одиночных промоторов в 1–8 раз в зависимости от клеточной линии МРЛ [92]. В другой работе удалось достичь высокого уровня экспрессии активатора апоптоза *tBid* в клетках рака молочной железы, используя гибридный промотор, состоящий из промоторов гена сурвивина человека и гена, кодирующего гликопротеин муцин, экспрессия которого повышена в клетках опухолей молочной железы [91]. Таким образом, применение двойных промоторов позволяет обеспечить высокий уровень экспрессии терапевтического гена в опухолевых клетках, сохраняя при этом раковую специфичность. Использование двойных опухолеспецифических промоторов позволяет получать более универсальные генно-терапевтические конструкции, т.е. конструкции, обеспечивающие экспрессию терапевтического гена во многих типах раковых клеток. Например, создан вектор, несущий два фрагмента гена *DT-A* под контролем промоторов генов *IGF2-P4* и *H19* [93]. Введение такого вектора в клетки нескольких линий рака мочевого пузыря обеспечивало экспрессию гена во всех линиях, тогда как ген *DT-A* под контролем одного из промоторов – *IGF2-P4* или *H19*, проявлял активность не во всех использованных линиях опухолевых клеток.

В настоящее время не описано систем двойных промоторов, содержащих меланомоспецифические промоторы. Однако создание систем на основе меланомоспецифических промоторов таких, например, как промоторы генов *MIA* и *TYR*, возможно, позволило бы обеспечить универсальную, высокоэффективную и специфическую экспрессию терапевтического гена в клетках меланомы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Терапия меланомы сопряжена с множеством трудностей, в числе которых высокая устойчивость меланомных клеток и раннее метастазирование, определяющее плохой прогноз. Необходимость воздействия на диссеминированные по всему организму метастатические локусы требует системного введения противомеланомных средств, что сопряжено с определенным риском воздействия на остальные клетки организма. Быстро развивающаяся генотерапия предлагает новые методики, позволяющие усилить специфичность воздействия на меланомные клетки одновременно со снижением вероятности повреждения здоровых клеток. Использование меланомоспецифических промоторов позволяет направленно воздействовать на клетки меланомы. Эти методы находятся на стадии развития и постоянно совершенствуются в поисках наиболее эффективных решений – от выбора оптимальных регуляторных элементов и создания конструкций на их основе до поиска новых векторов, в качестве которых используют как природные вирусы, так и искусственно создаваемые системы упаковки генетического материала [94, 95]. Можно надеяться, что в результате должна появиться простая и эффективная система элиминации меланом и ее метастазов.

Работа получила финансовую поддержку Российской Президентской программы «Ведущие научные школы» (НШ – 5638.2010.4), Программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и ФЦП (ГК № 16.512.12.2002).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Atallah E., Flaherty L. // *Curr. Treat. Options Oncol.* 2005. V. 6. P. 185–193.
- Bhatia S., Tykodi S.S., Thompson J.A. // *Oncology (Williston Park).* 2009. V. 23. P. 488–496.
- Ganesan P., Bakhshi S. // *Natl. Med. J. India.* 2010. V. 23. P. 21–27.
- Ko J.M., Fisher D.E. // *J. Pathol.* 2011. V. 223. P. 241–250.
- Nishizaki M., Fujiwara T., Tanida T., Hizuta A., Nishimori H., Tokino T., Nakamura Y., Bouvet M., Roth J.A., Tanaka N. // *Clin. Cancer Res.* 1999. V. 5. P. 1015–1023.
- Seth P. // *Cancer Biol. Ther.* 2005. V. 4. P. 512–517.
- Takeuchi M., Shichinohe T., Senmaru N., Miyamoto M., Fujita H., Takimoto M., Kondo S., Katoh H., Kuzumaki N. // *Gene Ther.* 2000. V. 7. P. 518–526.
- Denny W.A. // *J. Biomed. Biotechnol.* 2003. V. 2003. P. 48–70.
- Dudek A.Z. // *Transl. Res.* 2010. V. 156. P. 136–146.
- Springer C.J., Niculescu-Duvaz I. // *J. Clin. Invest.* 2000. V. 105. P. 1161–1167.
- Mullen C.A., Coale M.M., Lowe R., Blaese R.M. // *Cancer Res.* 1994. V. 54. P. 1503–1506.
- Sverdlov E. // *Molecular Genetics, Microbiology and Virology.* 2009. V. 24. P. 93–113.

13. Yamamoto S., Yamano T., Tanaka M., Hoon D.S., Takao S., Morishita R., Aikou T., Kaneda Y. // *Cancer Gene Ther.* 2003. V. 10. P. 179–186.
14. Ezzeddine Z.D., Martuza R.L., Platika D., Short M.P., Malick A., Choi B., Breakefield X.O. // *New Biol.* 1991. V. 3. P. 608–614.
15. Ambade A.V., Joshi G.V., Mulherkar R. // *Indian. J. Med. Res.* 2010. V. 132. P. 415–422.
16. Li S., Tokuyama T., Yamamoto J., Koide M., Yokota N., Namba H. // *Oncology.* 2005. V. 69. P. 503–508.
17. Erbs P., Regulier E., Kintz J., Leroy P., Poitevin Y., Exinger F., Jund R., Mehtali M. // *Cancer Res.* 2000. V. 60. P. 3813–3822.
18. Graepler F., Lemken M.L., Wybranietz W.A., Schmidt U., Smirnow I., Gross C.D., Spiegel M., Schenk A., Graf H., Lauer U.A., et al. // *World J. Gastroenterol.* 2005. V. 11. P. 6910–6919.
19. Robson T., Hirst D.G. // *J. Biomed. Biotechnol.* 2003. V. 2003. P. 110–137.
20. Saukkonen K., Hemminki A. // *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2004. V. 4. P. 683–696.
21. Lillehammer T., Tveito S., Engesaeter B.O., Fodstad O., Maelandsmo G.M., Engebraaten O. // *Cancer Gene Ther.* 2005. V. 12. P. 864–872.
22. Rothfels H., Paschen A., Schadendorf D. // *Exp. Dermatol.* 2003. V. 12. P. 799–810.
23. Hearing V.J., Tsukamoto K. // *FASEB J.* 1991. V. 5. P. 2902–2909.
24. Bentley N.J., Eisen T., Goding C.R. // *Mol. Cell Biol.* 1994. V. 14. P. 7996–8006.
25. Shibata K., Muraosa Y., Tomita Y., Tagami H., Shibahara S. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 20584–20588.
26. Siders W.M., Halloran P.J., Fenton R.G. // *Cancer Res.* 1996. V. 56. P. 5638–5646.
27. Sato S., Tanaka M., Miura H., Ikeo K., Gojobori T., Takeuchi T., Yamamoto H. // *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 2001. V. 6. P. 10–18.
28. Ganss R., Montoliu L., Monaghan A.P., Schutz G. // *EMBO J.* 1994. V. 13. P. 3083–3093.
29. Bosserhoff A.K., Moser M., Hein R., Landthaler M., Buettner R. // *J. Pathol.* 1999. V. 187. P. 446–454.
30. Dietz U.H., Sandell L.J. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 3311–3316.
31. Perez R.P., Zhang P., Bosserhoff A.K., Buettner R., Abu-Hadid M. // *Hum Pathol.* 2000. V. 31. P. 1381–1388.
32. Blesch A., Bosserhoff A.K., Apfel R., Behl C., Hessdoerfer B., Schmitt A., Jachimczak P., Lottspeich F., Buettner R., Bogdahn U. // *Cancer Res.* 1994. V. 54. P. 5695–5701.
33. Bosserhoff A.K., Echtenacher B., Hein R., Buettner R. // *Melanoma Res.* 2001. V. 11. P. 417–421.
34. Winklmeier A., Contreras-Shannon V., Arndt S., Melle C., Bosserhoff A.K. // *Cancer Sci.* 2009. V. 100. P. 261–268.
35. Bosserhoff A.K., Kaufmann M., Kaluza B., Bartke I., Zirngibl H., Hein R., Stolz W., Buettner R. // *Cancer Res.* 1997. V. 57. P. 3149–3153.
36. Bosserhoff A.K., Hein R., Bogdahn U., Buettner R. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 490–495.
37. Golob M., Buettner R., Bosserhoff A.K. // *J. Invest. Dermatol.* 2000. V. 115. P. 42–47.
38. Bosserhoff A.K., Kondo S., Moser M., Dietz U.H., Copeland N.G., Gilbert D.J., Jenkins N.A., Buettner R., Sandell L.J. // *Dev. Dyn.* 1997. V. 208. P. 516–525.
39. Roberts D.W., Newton R.A., Beaumont K.A., Helen Leonard J., Sturm R.A. // *Pigment Cell Res.* 2006. V. 19. P. 76–89.
40. Schwahn D.J., Xu W., Herrin A.B., Bales E.S., Medrano E.E. // *Pigment Cell Res.* 2001. V. 14. P. 32–39.
41. Salazar-Onfray F., Lopez M., Lundqvist A., Aguirre A., Escobar A., Serrano A., Korenblit C., Petersson M., Chhajlani V., Larsson O., et al. // *Br. J. Cancer.* 2002. V. 87. P. 414–422.
42. Thornwall M., Dimitriou A., Xu X., Larsson E., Chhajlani V. // *Horm. Res.* 1997. V. 48. P. 215–218.
43. Moro O., Ideta R., Ifuku O. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999. V. 262. P. 452–460.
44. Rouzaud F., Hearing V.J. // *Peptides.* 2005. V. 26. P. 1858–1870.
45. Aoki H., Moro O. // *Life Sci.* 2002. V. 71. P. 2171–2179.
46. Smith A.G., Box N.F., Marks L.H., Chen W., Smit D.J., Wyeth J.R., Huttley G.A., Eastal S., Sturm R.A. // *Gene.* 2001. V. 281. P. 81–94.
47. Tachibana M. // *Pigment Cell Res.* 2000. V. 13. P. 230–240.
48. Yasumoto K., Yokoyama K., Takahashi K., Tomita Y., Shibahara S. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 503–509.
49. Miccadei S., Pascucci B., Picardo M., Natali P.G., Civitareale D. // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2008. V. 27. P. 71.
50. Nettelbeck D.M., Rivera A.A., Balague C., Alemany R., Curiel D.T. // *Cancer Res.* 2002. V. 62. P. 4663–4670.
51. Peter I., Graf C., Dummer R., Schaffner W., Greber U.F., Hemmi S. // *Gene Ther.* 2003. V. 10. P. 530–539.
52. Stritzker J., Pilgrim S., Szalay A.A., Goebel W. // *BMC Cancer.* 2008. V. 8. P. 94.
53. Huang B., Zhao J., Shen S., Li H., He K.L., Shen G.X., Mayer L., Unkeless J., Li D., Yuan Y., et al. // *Cancer Res.* 2007. V. 67. P. 4346–4352.
54. Riedel C.U., Monk I.R., Casey P.G., Morrissey D., O'Sullivan G.C., Tangney M., Hill C., Gahan C.G. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2007. V. 73. P. 3091–3094.
55. Yu Y.A., Shabahang S., Timiryasova T.M., Zhang Q., Beltz R., Gentshev I., Goebel W., Szalay A.A. // *Nat. Biotechnol.* 2004. V. 22. P. 313–320.
56. McCart J.A., Wang Z.H., Xu H., Hu Y., Park B., Alexander H.R., Bartlett D.L. // *Mol. Ther.* 2002. V. 6. P. 471–480.
57. Sorscher E.J., Peng S., Bebok Z., Allan P.W., Bennett L.L., Jr., Parker W.B. // *Gene Ther.* 1994. V. 1. P. 233–238.
58. Schoensiegel F., Paschen A., Sieger S., Eskerski H., Mier W., Rothfels H., Kleinschmidt J., Schadendorf D., Haberkorn U. // *Cancer Gene Ther.* 2004. V. 11. P. 408–418.
59. Cong Y.S., Wright W.E., Shay J.W. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2002. V. 66. P. 407–425, table of contents.
60. Slater M., Scolyer R.A., Gidley-Baird A., Thompson J.F., Barden J.A. // *Melanoma Res.* 2003. V. 13. P. 137–145.
61. Dubois R.N., Abramson S.B., Crofford L., Gupta R.A., Simon L.S., van De Putte L.B., Lipsky P.E. // *FASEB J.* 1998. V. 12. P. 1063–1073.
62. Ristimaki A., Honkanen N., Jankala H., Sipponen P., Harkonen M. // *Cancer Res.* 1997. V. 57. P. 1276–1280.
63. Williams C., Shattuck-Brandt R.L., DuBois R.N. // *Ann. N.-Y. Acad. Sci.* 1999. V. 889. P. 72–83.
64. Denkert C., Kobel M., Berger S., Siegert A., Leclere A., Trefzger U., Hauptmann S. // *Cancer Res.* 2001. V. 61. P. 303–308.
65. Muller A., Homey B., Soto H., Ge N., Catron D., Buchanan M.E., McClanahan T., Murphy E., Yuan W., Wagner S.N., et al. // *Nature.* 2001. V. 410. P. 50–56.
66. Robledo M.M., Bartolome R.A., Longo N., Rodriguez-Frade J.M., Mellado M., Longo I., van Muijen G.N., Sanchez-Mateos P., Teixeira J. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 45098–45105.
67. Altieri D.C. // *Prog. Cell Cycle Res.* 2003. V. 5. P. 447–452.
68. Adida C., Crotty P.L., McGrath J., Berrebi D., Diebold J., Altieri D.C. // *Am. J. Pathol.* 1998. V. 152. P. 43–49.
69. Chiodini C., Cesinaro A.M., Ottani D., Fantini F., Giannetti A., Trentini G.P., Pincelli C. // *J. Invest. Dermatol.* 1999. V. 113. P. 415–418.
70. Sarela A.I., Verbeke C.S., Ramsdale J., Davies C.L., Markham A.F., Guillou P.J. // *Br. J. Cancer.* 2002. V. 86. P. 886–892.

71. Tanaka K., Iwamoto S., Gon G., Nohara T., Iwamoto M., Tanigawa N. // *Clin. Cancer Res.* 2000. V. 6. P. 127–134.
72. Bao R., Connolly D.C., Murphy M., Green J., Weinstein J.K., Pisarcik D.A., Hamilton T.C. // *J. Natl. Cancer Inst.* 2002. V. 94. P. 522–528.
73. Li X., Liu Y., Wen Z., Li C., Lu H., Tian M., Jin K., Sun L., Gao P., Yang E., et al. // *Mol. Cancer.* 2010. V. 9. P. 10.
74. Rohn J.L., Noteborn M.H. // *Apoptosis.* 2004. V. 9. P. 315–322.
75. Lu B., Makhija S.K., Nettelbeck D.M., Rivera A.A., Wang M., Komarova S., Zhou F., Yamamoto M., Haisma H.J., Alvarez R.D., et al. // *Gene Ther.* 2005. V. 12. P. 330–338.
76. Nettelbeck D.M., Rivera A.A., Davydova J., Dieckmann D., Yamamoto M., Curiel D.T. // *Melanoma Res.* 2003. V. 13. P. 287–292.
77. Huang R., Zhao Z., Ma X., Li S., Gong R., Kuang A. // *Cancer Gene Ther.* 2010. V. 18. P. 144–152.
78. Rein D.T., Breidenbach M., Nettelbeck D.M., Kawakami Y., Siegal G.P., Huh W.K., Wang M., Hemminki A., Bauerschmitz G.J., Yamamoto M., et al. // *J. Gene Med.* 2004. V. 6. P. 1281–1289.
79. van Houdt W.J., Haviv Y.S., Lu B., Wang M., Rivera A.A., Ulasov I.V., Lamfers M.L., Rein D., Lesniak M.S., Siegal G.P., et al. // *J. Neurosurg.* 2006. V. 104. P. 583–592.
80. Chen J.S., Liu J.C., Shen L., Rau K.M., Kuo H.P., Li Y.M., Shi D., Lee Y.C., Chang K.J., Hung M.C. // *Cancer Gene Ther.* 2004. V. 11. P. 740–747.
81. Konopka K., Spain C., Yen A., Overlid N., Gebremedhin S., Duzgunes N. // *Cell Mol. Biol. Lett.* 2009. V. 14. P. 70–89.
82. Zhu Z.B., Makhija S.K., Lu B., Wang M., Kaliberova L., Liu B., Rivera A.A., Nettelbeck D.M., Mahasreshti P.J., Leath C.A., et al. // *Cancer Gene Ther.* 2004. V. 11. P. 256–262.
83. Gu J., Fang B. // *Cancer Biol Ther.* 2003. V. 2. P. S64–70.
84. Hemmi S., Geertsen R., Mezzacasa A., Peter I., Dummer R. // *Hum. Gene Ther.* 1998. V. 9. P. 2363–2373.
85. Okada Y., Okada N., Nakagawa S., Mizuguchi H., Kanehira M., Nishino N., Takahashi K., Mizuno N., Hayakawa T., Mayumi T. // *Cancer Lett.* 2002. V. 177. P. 57–63.
86. Okada Y., Okada N., Mizuguchi H., Hayakawa T., Nakagawa S., Mayumi T. // *Cancer Gene Ther.* 2005. V. 12. P. 608–616.
87. Diaz R.M., Eisen T., Hart I.R., Vile R.G. // *J. Virol.* 1998. V. 72. P. 789–795.
88. Martinelli R., De Simone V. // *FEBS Lett.* 2005. V. 579. P. 153–156.
89. Lowings P., Yavuzer U., Goding C.R. // *Mol. Cell Biol.* 1992. V. 12. P. 3653–3662.
90. Davis J.J., Wang L., Dong F., Zhang L., Guo W., Teraishi F., Xu K., Ji L., Fang B. // *Cancer Gene Ther.* 2006. V. 13. P. 720–723.
91. Farokhimanesh S., Rahbarizadeh F., Rasaei M.J., Kamali A., Mashkani B. // *Biotechnol. Prog.* 2010. V. 26. P. 505–511.
92. Poulsen T.T., Pedersen N., Juel H., Poulsen H.S. // *Cancer Gene Ther.* 2008. V. 15. P. 563–575.
93. Amit D., Hochberg A. // *J. Transl. Med.* 2010. V. 8. P. 134.
94. Fernandez C.A., Rice K.G. // *Mol. Pharm.* 2009. V. 6. P. 1277–1289.
95. Yao H., Ng S.S., Tucker W.O., Tsang Y.K., Man K., Wang X.M., Chow B.K., Kung H.F., Tang G.P., Lin M.C. // *Biomaterials.* 2009. V. 30. P. 5793–5803.

УДК 577.21

Посттрансляционные модификации рибосомных белков *Escherichia coli*

М. В. Нестерчук*, П. В. Сергиев, О. А. Донцова

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: nesterchuk.mihail@gmail.com

Поступила в редакцию 14.02.2011 г.

РЕФЕРАТ В клетках *Escherichia coli* ряд рибосомных белков подвергается посттрансляционной модификации: шесть белков метилированы (S11, L3, L11, L7/L12, L16, L33), три – ацетилированы (S5, S18 и L7), один метилтиолирован (S12), к одному добавляются дополнительные аминокислотные остатки (S6), а у одного удаляются С-концевые аминокислотные остатки (L31). Функциональная значимость модификаций рибосомных белков в настоящее время не известна, они не относятся к жизненно необходимым для клетки и, вероятно, выполняют регуляторную роль. В обзоре рассмотрены все известные посттрансляционные модификации рибосомных белков *E. coli*, а также некоторые ферменты, осуществляющие модификацию, и механизм их действия.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА рибосомные белки, посттрансляционная модификация, *Escherichia coli*.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ РНК – рибонуклеиновая кислота; рРНК – рибосомная РНК; мРНК – матричная РНК; тРНК – транспортная РНК; IF2 – инициаторный фактор 2; EF-Tu – элонгационный фактор Tu; EF-G – элонгационный фактор G; RF3 – фактор терминирования 3; GTP – гуанозин-5'-трифосфат.

ВВЕДЕНИЕ

Рибосома – сложная молекулярная машина, отвечающая за правильный перевод генетической информации с последовательности нуклеотидов мРНК в последовательность аминокислот синтезируемого белка. Рибосома представляет собой комплекс рибосомных РНК (рРНК) и белков, который состоит из двух неравных частей (большой и малой субчастиц). Малая субчастица рибосом *Escherichia coli* состоит из 16S рРНК и 22 белков (обозначаемых S1–S22), а большая – из 5S и 23S рРНК и 34 различных белков (L1–L36). В клетке как рРНК, так и рибосомные белки подвергаются ферментативной модификации. Больше чем у половины рибосомных белков отщепляется N-концевой остаток метионина. Шесть белков метилированы (S11, L3, L11, L7/L12, L16, L33), три – ацетилированы (S5, S18 и L7), один метилтиолирован (S12), к одному добавляются дополнительные аминокислотные остатки (S6), а один подвергается частичному протеолизу (L31) (табл. 1). Природа некоторых модификаций рибосомных белков *E. coli* до сих пор не установлена [1].

Гены, которые кодируют ферменты, осуществляющие посттрансляционную модификацию, в большинстве случаев идентифицированы. Несмотря на это, функциональная роль этих модификаций практиче-

ски не изучена. Центральная роль рибосомы в механизме реализации генетической информации в клетке позволяет предположить, что модифицированные белки рибосомы могут быть важны для целого ряда механизмов регуляции экспрессии генов.

ПРОЦЕССИНГ N-КОНЦА РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ

Самый распространенный тип посттрансляционной модификации белков – удаление N-концевого остатка метионина, осуществляемое метионин-аминопептидазой (MAP). Концевой метионин отщепляется у 34 из 57 рибосомных белков *E. coli* (табл. 2).

Эта модификация наиболее часто встречается в белках, в которых следующий за метионином аминокислотный остаток имеет короткую боковую цепь [2]. Большие боковые цепи препятствуют попаданию белка в активный центр метионин-аминопептидазы. Если в молекуле белка второй остаток – аланин (21 случай), а также лейцин, пролин или глицин, то N-концевой метионин всегда отщепляется. Если же за первым остатком следуют лизин, изолейцин, глутамин, аргинин, аспарагиновая кислота, тирозин, глутаминовая кислота, фенилаланин или валин, как это наблюдается у 20 рибосомных белков, то N-концевой остаток метионина всегда сохраняется в молекуле

Таблица 1. Модификации рибосомных белков *E. coli*

Белок	Положение модификации	Модификация	Модифицирующий фермент
S5	N-концевая аминокислотная группа	Ацетилирование	RimJ
S6	C-конец	Добавление дополнительных остатков глутаминовой кислоты	RimK
S11	N-концевая аминокислотная группа	Метилирование, образование изопептидной связи	Не установлен
		Образование остатка изоаспартата	Не установлен
S12	Asp88	Метилтиолирование	RimO
S18	N-концевая аминокислотная группа	Ацетилирование	RimI
L3	Gln150	Метилирование	PrmB
L7/L12	Lys81	Метилирование	Не установлен
L11	Ala1, Lys3, Lys39	Метилирование	PrmA
L12	N-концевая аминокислотная группа	Ацетилирование	RimL
L16	N-концевая аминокислотная группа	Метилирование	Не установлен
L31	C-конец	Удаление аминокислотных остатков	Не установлен
L33	N-концевая аминокислотная группа	Метилирование	Не установлен

белка. Когда в положении 2 находится серин, в четырех случаях из пяти остаток метионина сохраняется. Следует отметить, что остатки метионина удаляются только из некоторой доли молекул белка L33, часть цепей (не более 25%) остается с N-концевым метилированным метионином. Вероятно, это связано с конкуренцией N-концевого метилирования и отщепления метионина [3].

ПРОЦЕССИНГ С-КОНЦА БЕЛКА L31

Определенная химическим путем С-концевая аминокислотная последовательность рибосомного белка L31 (...RFNPK) [4] отличается от предсказанной по нуклеотидной последовательности гена этого белка (...RFNKRFPNIPGSK). Был сделан вывод, что белок L31 подвергается С-концевому процессингу (возможно, существует специфическая протеаза, удаляющая фрагмент RFNIPGSK). В дальнейшем эти данные опровергли и показали, что первичная структура L31 согласуется с геномной [5]. Однако масс-спектрометрический анализ рибосомных белков выявляет два пика для L31: при 7871.1 Да, который соответствует полной последовательности L31, предсказанной по геномной, и при 6971.1 Да, соответствующий фрагменту L31 без С-концевого участка ...RFNIPGSK [1]. По-видимому, процессируется только часть молекул белка L31.

L31 – малоизученный компонент бактериальной рибосомы. Известно, что L31 образует рибонуклеопротеидный комплекс с белками L5, L18, L25 и 5S рРНК, он располагается на вершине центрального протуберанца в непосредственной близости к месту контакта субчастиц. Посттрансляционная модифи-

кация служит, возможно, для активации белка либо играет регуляторную роль. Однако данных о функции сайт-специфического протеолиза L31, как и о его возможном механизме, нет.

Интересно, что геном *E. coli* содержит два гена белка L31 со сходной, но не идентичной последовательностью [6]. Белок L31, присутствующий в клетках в «обычных» лабораторных условиях культивирования, содержит мотив «цинковая лента». При недостатке ионов цинка при помощи транскрипционного регулятора Zur активируется экспрессия другого варианта L31, лишенного «цинковой ленты». Это переключение, по-видимому, способствует более экономному использованию ионов цинка в клетке. Аналогичный механизм описан для рибосомного белка L36 [7].

МЕТИЛИРОВАНИЕ РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ

Метилирование – один из наиболее распространенных типов посттрансляционной модификации белков, которому подвергаются самые разные прокариотические и эукариотические белки. Метилирование осуществляется специальными ферментами (метилтрансферазами), которые используют S-аденозилметионин в качестве донора метильных групп. Выделяют пять классов метилтрансфераз, отличающихся структурой и субстратной специфичностью.

Как правило, метилирование рибосомных белков происходит по боковой аминокислотной группе лизина или аргинина, часто встречается и метилирование N-концевой аминокислотной группы. В клетках *E. coli* метилированы шесть рибосомных белков (табл. 1) [8]. Идентифицированы

Таблица 2. Посттрансляционное удаление N-концевого остатка метионина в рибосомных белках *E. coli* [1]

Белок	Удаление Met	Второй остаток после Met
S1	?	Thr
S2	+	Ala
S3	+	Gly
S4	+	Ala
S5	+	Ala
S6	-	Arg
S7	+	Pro
S8	+	Ser
S9	+	Ala
S10	-	Gln
S11	+	Ala
S12	+	Ala
S13	+	Ala
S14	+	Ala
S15	+	Ser
S16	-	Val
S17	+	Thr
S18	+	Ala
S19	+	Pro
S20	+	Ala
S21	+	Pro
S22	-	Lys
L1	+	Ala
L2	+	Ala
L3	-	Ile
L4	-	Glu
L5	+	Ala
L6	+	Ser
L7	+	Ser
L9	-	Gln
L10	+	Ala
L11	+	Ala
L12	+	Ser
L13	-	Lys
L14	-	Ile
L15	-	Arg
L16	-	Leu
L17	-	Arg
L18	-	Asp
L19	-	Ser
L20	+	Ala
L21	-	Tyr
L22	-	Glu
L23	-	Ile
L24	+	Ala
L25	-	Phe
L26	+	Ala
L27	+	Ala
L28	+	Ser
L29	-	Lys
L30	+	Ala
L31	-	Lys
L32	+	Ala
L33	+	Ala
L34	-	Lys
L35	+	Pro
L36	-	Lys

специфичные для двух белков (L11 и L3) метилтрансферазы (PrmA и PrmB соответственно), найдены кодирующие их гены. Об остальных модификациях известно очень немного.

Некоторые метилированные рибосомные белки играют важную роль в функционировании рибосомы: L7/L12 и L11 взаимодействуют с факторами трансляции, L3 участвует в сборке рибосомы. Однако, несмотря на то что функции этих рибосомных белков достаточно хорошо изучены, биологическое значение их метилирования до сих пор не выяснено. Мутации в генах, кодирующих соответствующие метилтрансферазы, не приводят к заметным фенотипическим изменениям. Вероятно, метилирование регулирует внутри- и межмолекулярные взаимодействия в белке или влияет на его сродство к РНК и таким образом действует на различные клеточные процессы – регуляцию трансляции, ее точность, процессинг РНК и сборку рибосомы.

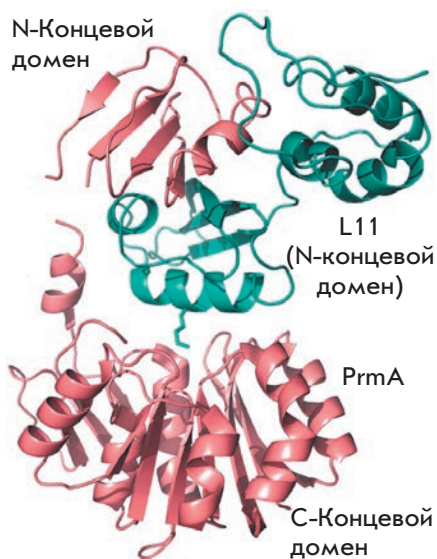
Метилирование белка L11

Наиболее сильно метилированный белок бактериального аппарата трансляции – рибосомный белок L11 [9]. Он содержит три метилированных аминокислотных остатка: N-концевой остаток аланина три-метилирован по α-аминогруппе, 3-й и 39-й остатки лизина триметилированы по ε-аминогруппам. Таким образом, всего к белку посттрансляционно присоединяются девять метильных групп [10]. Метилирование осуществляет один фермент – PrmA (protein modification), который был выделен и охарактеризован [11]. Установлено, что это белок массой 31 кДа, использующий в качестве донора метильной группы S-аденозилметионин и преимущественно модифицирующий свободный белок L11. Последнее указывает на то, что метилирование предшествует встраиванию белка в рибосому [11].

Получен мутантный штамм *E. coli*, не содержащий метильных групп в белке L11. С помощью этого штамма определено положение гена *prmA*, кодирующего метилтрансферазу PrmA [12].

Этот фермент обладает необычной субстратной специфичностью, что позволяет ему модифицировать несколько аминокислотных остатков белка, принадлежащих разным аминокислотным остаткам и расположенным различным образом по отношению к пептидному скелету (α- и ε-аминогруппы). Для этого фермент должен либо связываться с субстратом в нескольких разных ориентациях, либо для множественной модификации использовать систему гибкого субстратного позиционирования, позволяющую переориентировать субстрат относительно постоянного участка связывания. Строение PrmA и механизм его взаимодействия с субстратом подробно изучен [13, 14].

Рис. 1. Структура PrmA в комплексе с N-концевым доменом L11. PrmA и L11 показаны розовым и голубым. Боковая цепь остатка Lys39 показана в каркасном виде [13].



Метилтрансфераза PrmA состоит из двух доменов, соединенных гибким линкером (рис. 1). Большой каталитический С-концевой домен является типичным примером метилтрансфераз класса I. Семитяжевой β -лист фланкирован с обеих сторон α -спиралями. Небольшой дополнительный трехтяжевой β -лист служит связующим звеном между С-концевым доменом и линкерной междоменной α -спиралью. Маленький N-концевой домен состоит из четырехтяжевого β -листа, фланкированного с одной стороны междоменной линкерной α -спиралью, с другой – N-концевой α -спиралью. N-Концевой домен PrmA уникален, он способен распознавать и связывать белок L11 (рис. 1) [13]. С помощью биоинформатических методов установлено, что N-концевой домен PrmA по структуре напоминает V-домен фактора EF-G, который при связывании с рибосомой находится в непосредственной близости к белку L11 [15].

Поверхность связывания N-концевого домена PrmA с белком L11 частично перекрывается с поверхностью связывания L11 с 23S рРНК. Поэтому PrmA модифицирует L11 только в свободном состоянии, до его встраивания в рибосому. Это подтверждает ранее полученные данные метилирования L11 *in vitro* [11]. Связывание N-концевого домена PrmA с L11 высокоспецифично, стабилизировано множеством водородных связей, тогда как каталитический С-концевой домен сам по себе не обладает специфичностью, его взаимодействие с субстратом стабилизировано лишь локальным гидрофобным взаимодействием (боковая цепь модифицируемого остатка лизина попадает в активный центр через туннель, образованный гидрофобными аминокислотными остатками, которые взаимодействуют с гидрофобной частью бокового радикала лизина). За счет гибкости

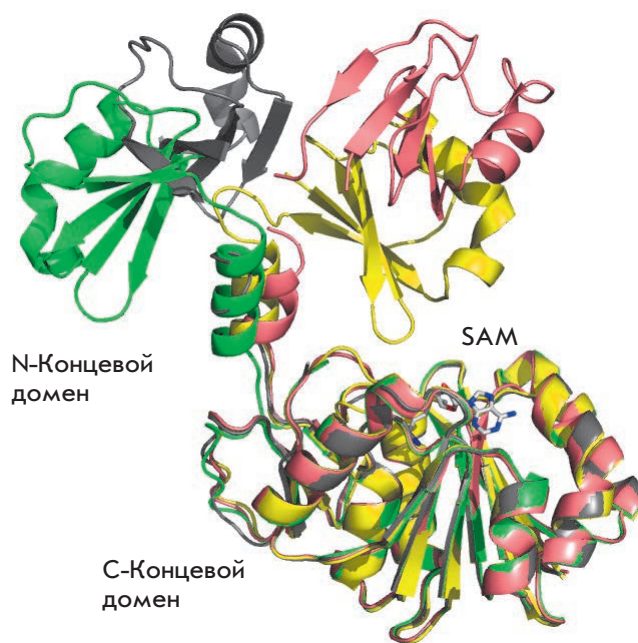


Рис. 2. Наложение структур PrmA в четырех различных конформациях. Зеленым и серым показаны две конформации PrmA в свободном состоянии, желтым – комплекс PrmA и SAM, розовым – в комплексе с L11. Видна высокая подвижность N-концевого домена [13].

междоменного линкера каталитический домен может изменять свое положение относительно связанного с L11 N-концевого домена и метилировать все доступные для него аминокислотные группы (рис. 2).

В структуре каталитического домена имеется специальный гидрофобный карман для связывания S-аденозилметионина, этот карман открыт, т.е. возможен обмен между S-аденозилгомоцистеином (продуктом реакции) и S-аденозилметионином без нарушения фермент-субстратного комплекса. В активном центре PrmA нет атомов, затрудняющих вращение метилированной аминокислотной группы, что позволяет однажды связавшемуся с субстратом ферменту сразу три метилировать его. Для метилирования аминокислотной группы необходимо, чтобы каталитический центр содержал основной аминокислотный остаток, акцептирующий протон с атома азота. Роль такого остатка, очевидно, выполняет His104, находящийся в активном центре напротив участка связывания кофактора.

Таким образом, метилирование, осуществляемое ферментом PrmA, служит редким примером одновременного специфического узнавания мишени и множественной модификации субстрата за счет разделения в пространстве участка связывания и каталитического центра, а также их взаимной подвижности. Одна молекула метилтрансферазы способна последовательно ввести девять метильных групп

в белок L11 без диссоциации фермент-субстратного комплекса.

Белок L11 – это консервативный компонент большой субчастицы бактериальной рибосомы и активный участник взаимодействия рибосомы с факторами инициации, элонгации и терминации трансляции. Он состоит из двух доменов, соединенных между собой гибким линкером: С-концевого, связывающего 23S рРНК, и N-концевого, взаимодействующего с факторами трансляции [13]. N-Концевой домен является мишенью антибиотика тиострептона, который ингибирует связывание EF-G с рибосомой (устойчивость к тиострептону обеспечивается рядом мутаций в N-концевом домене белка L11) [16]. Методом криоэлектронной микроскопии показано, что N-концевой домен L11 прямо контактирует с факторами EF-G [15] и EF-Tu [17].

Все аминокислотные остатки, которые триметилируются PrmA, находятся в N-концевом домене. Такое расположение модифицированных остатков рядом с местом контакта с факторами трансляции может указывать на функциональную значимость метилирования. Структура PrmA консервативна у всех бактерий, что также может свидетельствовать о его вкладе в функционирование L11. Но, тем не менее, функция модификации, осуществляемой PrmA, до сих пор не установлена. Штамм с мутацией гена *prmA* не только жизнеспособен, но и не имеет никаких заметных отличий от штамма дикого типа (одинаковая скорость роста и одинаковое поведение в стрессовых условиях) [18, 19]. Это означает, что множественное метилирование L11 не является необходимым для нормального функционирования рибосомы. В то же время оно может влиять на скорость и точность таких этапов работы рибосомы, как декодирование и транслокация, что можно зафиксировать только с применением очень точного кинетического анализа *in vitro* либо введением специфических мутаций в белок L11 или другие компоненты аппарата трансляции *in vivo* [13].

Метилирование белка L3

К рибосомному белку L3 посттрансляционно добавляется одна метильная группа [20]. Метилирование происходит по амидной группе 150-го остатка глутамина [21]. Модификацию осуществляет специфическая метилтрансфераза PrmB, ген которой идентифицирован [12]. PrmB – первая описанная метилтрансфераза, мишенью которой служит амидный атом азота.

У штамма, содержащего мутацию в гене *prmB*, отсутствие метилирования в белке L3 сочетается с чувствительностью к холоду. Скорость роста мутантных клеток при 22°C значительно ниже, чем у клеток дикого типа [22, 23]. Это связано с тем, что при низкой

температуре сборка рибосом в мутантных клетках происходит неэффективно, а по структуре и стабильности образующиеся промежуточные рибонуклеопротеидные комплексы отличаются от соответствующих интермедиатов в штамме дикого типа. Тем не менее, полностью сформированные при пониженной температуре мутантные рибосомы не отличаются по стабильности от рибосом дикого типа. Разницы в скорости трансляции и ее точности также не наблюдается ни *in vivo*, ни *in vitro* [22].

Изучение активности фермента PrmB *in vitro* показало, что белок L3 в свободном состоянии не метилируется. Полностью собранную рибосому метилтрансфераза также не модифицирует. Наибольшая активность наблюдается в частично собранной рибосоме, а также в присутствии в реакционной смеси рРНК (любой, не обязательно рибосомной) [22].

Белок L3 связывается с 3'-концевым участком 23S рРНК на самом первом этапе сворачивания структуры и является, наряду с L24, инициатором всего процесса сборки рибосомы [24].

Из сказанного можно сделать вывод, что *in vivo* PrmB осуществляет метилирование L3, связываясь с рибосомой на одном из промежуточных этапов ее сворачивания, и, вероятно, оказывает определенное влияние на правильность ее упаковки. Таким образом, фермент PrmB можно отнести к факторам сборки рибосомы.

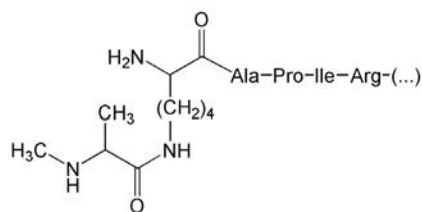
Белок L3 имеет глобулярный домен, располагающийся на поверхности рибосомы, и длинный глубоко погруженный внутрь отросток. Модифицированный 150-й остаток глутамина располагается внутри рибосомы рядом с туннелем для растущей полипептидной цепи, он образует контакты с нуклеотидными остатками G2032, C2055 и A2572, которые находятся в 3'-концевой области 23S рРНК. Очевидно, этот остаток вносит вклад в формирование и поддержание правильной конформации рРНК.

Метилирование белка S11 и образование изомерной пептидной связи

В рибосомном белке S11 метилированию подвергается N-концевая аминокислотная группа, принадлежащая остатку аланина. Помимо метилирования наблюдается образование изопептидной связи. Этой модификации подвержен только один белок *E. coli*, S11. При этом разрушается пептидная связь между первым и вторым остатками (аланин и лизин) в молекуле S11 (рис. 3) [25].

В работе [26] сообщается, что в белке S11 обнаружен остаток изоаспартата. На один моль белка приходится 0.5 моль изоаспартата. При этом показано, что в логарифмической фазе роста такую модификацию имеет только S11.

Рис. 3. Структура метилированного N-концевого остатка S11, образующего изопептидную связь [25].



Ферменты, осуществляющие перечисленные модификации, не установлены, как и функциональная роль модификаций.

Белок S11 находится в непосредственной близости к мРНК и тРНК в E-участке. Его N-конец, выступающий на поверхность рибосомы, не виден в кристаллической структуре и, вероятно, не имеет фиксированной ориентации. Маловероятно, что модифицированный остаток вносит вклад в поддержание структуры рибосомы. Возможно, метилированный N-конец S11 взаимодействует с тРНК и облегчает ее выход из E-участка.

Метилирование белка L7/L12

Рибосомный белок L7/L12 монометилирован по ϵ -аминогруппе 81-го остатка лизина. Степень метилирования сильно зависит от температуры. При 37°C модификации практически не наблюдается (меньше 0.1 метильной группы на молекулу белка). С понижением температуры количество вводимых групп резко увеличивается и при 27°C составляет 0.6 остатка монометиллизина на молекулу белка [27]. Фермент, осуществляющий эту модификацию, не установлен.

В составе рибосомы белок L7/L12 находится в виде тетрамера, представляющего собой палочковидный отросток, так называемый «L7/L12-стержень». Каждая цепь в тетрамере состоит из двух доменов: N-концевого, связывающегося с белком L10, и C-концевого. Домены соединены гибким линкером, позволяющим C-концевым доменам свободно изменять свое положение относительно большой субчастицы. Таким образом, L7/L12 – единственный рибосомный белок, не контактирующий непосредственно с рРНК, он связан с ней через комплекс с белком L10. Этот комплекс выполняет важную роль в процессе трансляции, он участвует в связывании с рибосомой факторов трансляции (IF2, EF-Tu, EF-G и RF3) [28]. Метилированные остатки располагаются в C-концевом домене и, возможно, вносят свой вклад во взаимодействие с факторами трансляции.

Метилирование белков L16 и L33

В рибосомных белках L16 и L33 метилированию подвергаются N-концевые аминокислоты. В L16 моди-

фицирован первый остаток метионина [29]. А в L33 часть полипептидных цепей начинается с монометилированного метионина (не более 25%), а часть – с монометилированного аланина [30]. Подобная гетерогенность, по-видимому, связана с конкуренцией процессов метилирования и отщепления N-концевого метионина. Предположение о возможном восстановлении N-формилметионина до N-метилметионина было опровергнуто [3].

Метилтрансферазы, осуществляющие модификацию белков L16 и L33, не идентифицированы.

В белке L16 обнаружен еще один вид модификации. Исходя из аминокислотной последовательности, белок L16 должен иметь массу 15281.3 Да. Однако на масс-спектре этого белка нет пика, соответствующего такой массе, но есть пик для массы 15326.2 Да, что на 44.9 Да больше. Метильная группа на N-конце белка увеличивает его массу только на 14 Да. Это означает, что молекула L16 должна содержать, как минимум, еще одну посттрансляционную модификацию. Предположительно, Arg81 подвергается гидроксигидроксилированию, но и в этом случае модифицированный белок должен быть на 14.9 Да легче наблюдаемого масс-спектрометрически [1]. Возможно, имеет место еще одно метилирование или гидроксигидроксилирование. Более определенные данные о природе и локализации неизвестной модификации будут получены из масс-спектров продуктов трипсинолиза белка L16.

Белки L16 и L33 располагаются рядом с центральным протуберанцем с противоположных сторон. Их N-концевые остатки выходят на поверхность рибосомы и не образуют прямых контактов с рРНК и белками.

АЦЕТИЛИРОВАНИЕ РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ

N^α-ацетилирование белков катализируется N^α-ацетилтрансферазами, которые переносят ацетильную группу с ацетилкофермента А на N-концевую аминокислотную группу белка. У эукариот такая модификация белков встречается повсеместно – 80–90% цитоплазматических белков у млекопитающих и 50% у дрожжей ацетилированы по N-концевому аминокислотному остатку [31]. У прокариот такая модификация осуществляется редко. Известно всего четыре белка *E. coli*, которые ей подвергаются: фактор EF-Tu, а также рибосомные белки S5, S18 и L7. Определены гены, кодирующие ферменты, которые осуществляют модификацию рибосомных белков S5, S18 и L7: *rimJ*, *rimI* и *rimL* соответственно. Каждая из перечисленных ацетилтрансфераз специфически модифицирует только один белок (в отличие от эукариот, у которых такие ферменты менее специфичны). Несмотря на сходные функции, структуры этих ферментов сильно различаются. Сходство

последовательностей RimI (148 остатков), RimJ (194 остатка) и RimL (178 остатков) составляет 19 и 20% соответственно, а между RimJ и RimL – 23% (хотя RimI и RimJ – аланин-ацетилтрансферазы, а RimL – серин-ацетилтрансфераза). Вероятно, эти белки не имели общего предка и эволюционировали независимо друг от друга [32].

Эукариотические N^α-ацетилтрансферазы, как правило, состоят из двух или трех различных субъединиц, они модифицируют субстрат котрансляционно, тогда как прокариотические ферменты чаще мономерны или представляют собой гомодимеры (например, RimL) и ацетируют субстрат посттрансляционно [33].

Ацетилирование белка S5

Рибосомный белок S5 ацетилирован по α-аминогруппе первого остатка аланина [34]. Ацетилирование осуществляется специфическим ферментом RimJ (ribosomal modification) [35]. Идентифицирован и секвенирован ген *rimJ*, кодирующий этот фермент [36].

Установлена субстратная специфичность RimJ. В работе [37] авторы исследовали штамм *E. coli*, содержащий мутацию в центральном псевдоузле 16S рРНК (С18А). Эта мутация приводит к нарушению сборки 30S субчастицы, ухудшению связывания с ней белков S1, S2, S18 и S21 и, следовательно, к снижению эффективности трансляции. Помимо этого, мутация вызывает уменьшение доли ацетилированных молекул S5, т.е. снижается активность RimJ. Это, очевидно, связано с тем, что S5 находится в непосредственной близости к центральному псевдоузлу, мутации в котором могут изменять место посадки S5 на 30S субчастицу, тогда RimJ не может связываться с субстратом. Стоит отметить, что в собранных 70S мутантных рибосомах неацетилированный S5 не найден. Видимо, связывание мутантной 30S субчастицы с 50S стабилизирует функционально активную конформацию 30S субчастицы. Находясь в этой конформации, 30S субчастица становится субстратом RimJ. Ранее было показано, что мутация в белке S4 также приводит к меньшей эффективности ацетилирования S5 [38]. Эти данные свидетельствуют о том, что ацетилирование S5 осуществляется на собранной рибосоме.

Функция RimJ связана не только с модификацией белка S5, но и с другими этапами биогенеза малой субчастицы рибосомы [39]. В штамме *E. coli* с мутацией в гене белка S5 (28-й остаток глицина заменен на аспарагиновую кислоту) нарушена сборка рибосом и снижена точность трансляции, наблюдается чувствительность к холоду. Суперэкспрессия RimJ в этом штамме полностью восстанавливает все дефекты трансляции. Это означает, что независимо от ацетилтрансфераз-

ной активности RimJ вносит вклад в формирование правильной структуры рибосомы. Доказательством может служить то, что RimJ связывается с 30S субчастицей на ранних стадиях ее сборки [39]. Функции RimJ как фактора сборки рибосомы и ацетилтрансферазы могут совмещаться и осуществляться одновременно или последовательно.

Белок S5 располагается на противоположной по отношению к декодирующему центру стороне малой субчастицы. N-Концевые остатки выступают над поверхностью рибосомы и не видны в кристаллической структуре. Значит, α-аминогруппа первого остатка белка S5 в составе рибосомы доступна для ацетилирования, что согласуется с результатами работы [37].

Белок RimJ выполняет функции, не связанные напрямую с ацетилированием S5. Показано, что RimJ является репрессором оперона *pap*, отвечающего за биосинтез пилей в патогенном штамме *E. coli*, вызывающем пиелонефрит. RimJ регулирует транскрипцию этого оперона в зависимости от внешних условий (температура, наличие питательных веществ). Механизм этой регуляции и ее связь с ацетилтрансферазной функцией RimJ не установлены [40].

Ацетилирование белка S18

Белок S18, как и S5 и L12, подвергается N-концевому ацетилированию (по остатку аланина) [41]. Модификация осуществляется специфической ацетилтрансферазой, кодируемой геном *rimI* [36].

Ацетилирование S18 не относится к модификациям, необходимым для клетки. Клетки с мутациями в гене *rimI* не только жизнеспособны, но и не отличаются фенотипически от клеток дикого типа [42].

Определена пространственная структура RimI из *Salmonella typhimurium* (первичная структура полностью идентична RimI из *E. coli*) [32]. Фермент имеет смешанную αβ-структуру с центральным семитяжевым β-листом, фланкированным четырьмя α-спиралями (рис. 4). Центральный β-лист имеет преимущественно антипараллельную структуру, за исключением параллельных тяжей 4 и 5. Порядок β-тяжей в листе линейный, кроме тяжа β7, расположенного между β5 и β6. Лист имеет V-образную структуру, в которой тяжи β1–β4 формируют одно плечо, а β5–β7 – другое. Предполагается, что в V-образном расширении между β4- и β5-тяжами располагается ацетилтрансферазный центр.

Исходя из данных о пространственной структуре комплекса фермента с субстратом и коферментом (ацетилкоферментом А), предложен механизм ацетилтрансферазной реакции (рис. 5).

N-Концевой атом азота S18 нуклеофильно атакует карбонильный атом углерода ацетилкофермента А,



Рис. 4. Структура комплекса RimI-бисубстрат. Бисубстрат показан в каркасном виде. Элементы вторичной структуры окрашены зеленым ($\beta 1$, $\alpha 1$, $\alpha 2$), желтым ($\beta 2$ – $\beta 4$), красным ($\alpha 3$, $\beta 5$) и синим ($\alpha 4$, $\beta 6$, $\beta 7$) в порядке их следования с N-конца [32].

остаток Glu103 выступает здесь как акцептор протона (рис. 5а). Это приводит к образованию тетраэдрического интермедиата (рис. 5б). При распаде интермедиата Tyr115 служит донором протона (рис. 5в).

Несмотря на то что установлен механизм ацетилирования S18, до сих пор не выяснено, в чем состоит функция ацетилирования, и когда оно происходит. Белок S18 располагается в центральном домене малой субчастицы рибосомы рядом с белками S11 и S6,

причем взаимодействие S18 с S6 настолько прочное, что образуется стабильный гетеродимер [43]. S18 находится вблизи E-участка. Первые 15 N-концевых остатков S18 не видны в кристаллической структуре рибосомы, а значит, скорее всего, не имеют фиксированного положения в пространстве. Возможно, они располагаются рядом с участком посадки мРНК на малую субчастицу. В этом случае N-концевое ацетилирование может влиять на процесс инициации трансляции.

Ацетилирование белка L12

Рибосомный белок L12 существует в двух различных формах: неацетилированной (L12) и ацетилированной (называемой L7) [44]. Из-за идентичности аминокислотных последовательностей этот белок называют L7/L12.

Ацетилирование α -атома азота Ser1 в белке L12 осуществляется специфическим ферментом RimL и приводит к образованию L7 [45]. RimL может ацетилировать *in vitro* как свободный белок L12 [46], так и L12 в составе рибосомы [33]. По-видимому, *in vivo* модификация L12 тоже может происходить на любом этапе биогенеза рибосомы. В отличие от полностью модифицированных S5 и S18, L12 ацетилирован лишь частично. Соотношение L7/L12 варьирует в зависимости от фазы и скорости роста клеток. В середине логарифмической фазы доля L12 достигает 85%, затем содержание L7 постепенно увеличивается до 75–80% в стационарной фазе [47]. При росте клеток в минимальной среде белок целиком переходит в форму L7.

Показано, что модификация L12 повышает прочность комплекса тетрамера L7/L12 с белком L10 [48]. Авторы объясняют это тем, что ацетилирование стабилизирует N-концевые α -спирали L7 (на рис. 6 обозначены $\alpha 1$), фиксируя положение N-концевого

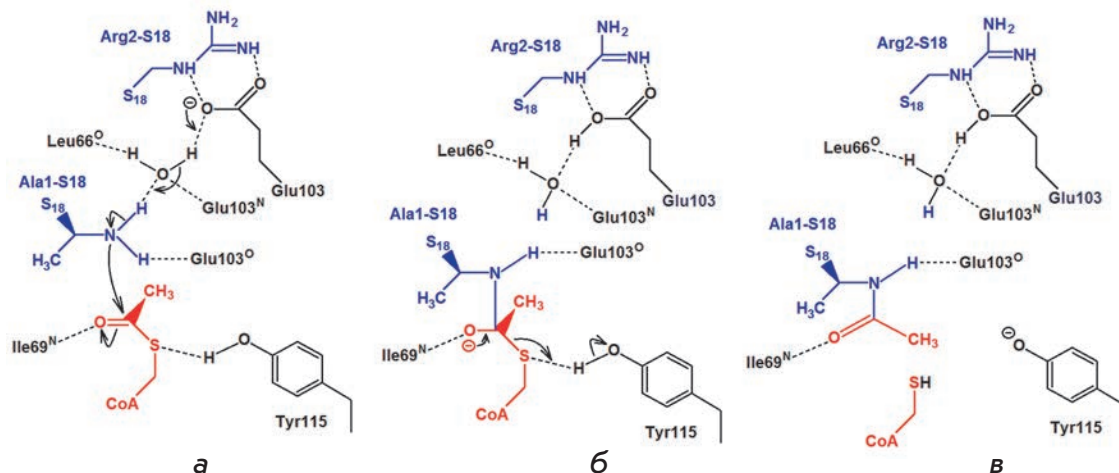


Рис. 5. Предполагаемый механизм реакции, катализируемой ферментом RimI. а – нуклеофильная атака карбонильного атома ацетилкофермента А; б – образование тетраэдрического интермедиата; в – комплекс RimI с продуктами [32].

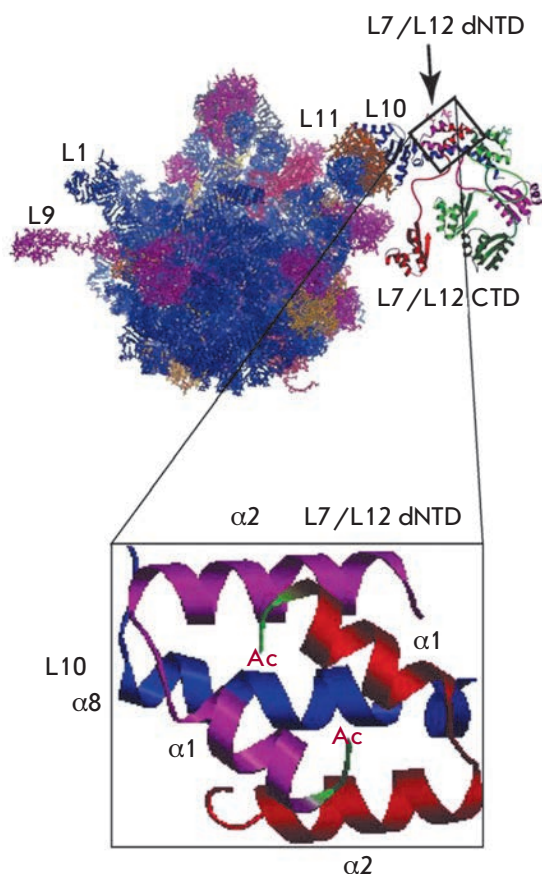


Рис. 6. Гипотетическая модель рибосомы *E. coli* с входящим в ее состав комплексом L7/L12 и L10. L10 показан синим, димеры L7/L12 – красным/фиолетовым и оттенками зеленого. Более детальное изображение взаимодействия димера N-концевых доменов L7/L12 со спиралью $\alpha 8$ белка L10 иллюстрирует гипотезу о том, что N-концевое ацетилирование приводит к более сильному связыванию N-концевого домена L7/L12 с белком L10 [48].

остатка в пространстве и компактизуя тем самым структуру, делает ее более прочной.

Тем не менее, штамм с мутацией в гене *rimL*, в котором весь белок L12 находится в деацетилированной форме, не имеет никаких заметных фенотипических отличий от штамма дикого типа. В частности, нет разницы в скорости роста клеток при 25, 37 и 42°C [46]. Значит, модификация не важна для функционирования рибосомы, а вопрос о ее возможной функции до сих пор остается открытым.

Субстратная специфичность RimL и природа N-концевого аминокислотного остатка субстрата изучена в работе [33]. Согласно опубликованным данным, в N^α-ацетилированных белках это, как правило, серин, аланин или метионин. Например, в L12

из *E. coli* это серин, в L12 из *Pseudomonas aeruginosa* и *Bacillus subtilis* – аланин, как и в S18 и S5 *E. coli*. Предположение об отсутствии у RimL специфичности к N-концевому остатку было подтверждено экспериментально. RimL эффективно ацетилюет *in vitro* мутантный L12, в котором Ser1 заменен на Ala1 [33].

В случае эукариотических N^α-ацетилтрансфераз второй аминокислотный остаток N^α-ацетилируемого белка влияет на модификацию первого. Если второй остаток – аспартат или глутамат, то модификация происходит эффективно. Чтобы исследовать влияние второго аминокислотного остатка на активность RimL, получили мутантный L12, в котором Ile2 заменили на Asp2. Оказалось, что RimL ацетилюет такой мутантный белок гораздо менее эффективно, чем нативный L12. Это еще раз подчеркивает отличие прокариотических N^α-ацетилтрансфераз от эукариотических [33].

Получена кристаллическая структура RimL из *Salmonella typhimurium* (сходство первичной структуры с RimL из *E. coli* составляет 83%). RimL представляет собой гомодимер, способный связать две молекулы ацетилкофермента А и модифицировать димерный L12 [49].

МЕТИЛТИОЛИРОВАНИЕ БЕЛКА S12

Первичную структуру рибосомного белка S12 *E. coli* определили химическим путем, однако его 88-й аминокислотный остаток установить не удалось [50]. Последующее секвенирование гена, кодирующего S12, показало, что в этой позиции находится аспарагиновая кислота [51]. И только через 20 лет, используя масс-спектрометрический анализ, показали, что молекулярная масса S12 равна 13652 Да (на 46.1 Да больше, чем предсказано по нуклеотидной последовательности) [1]. Дальнейшее изучение этого феномена показало, что такое несоответствие обусловлено наличием метилтиоэфирной группы (-SCH₃) (рис. 7) у β-атома углерода Asp88 [52]. Еще позднее нашли ген *rimO*, который кодирует метилтиотрансферазу, осуществляющую данную посттрансляционную модификацию [53].

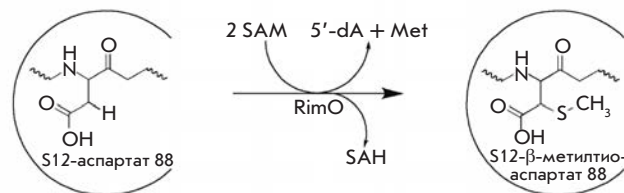


Рис. 7. Реакция, катализируемая RimO. Метилтиолирование остатка Asp88 белка S12.

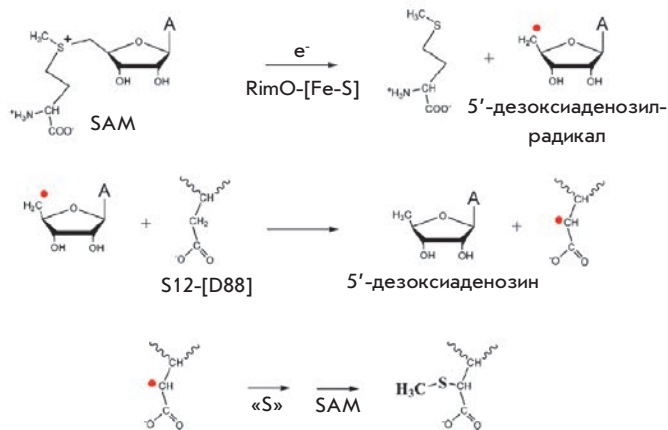


Рис. 8. Механизм реакции, катализируемой RimO [55].

Эта реакция – пример достаточно редкого в природе ферментативного образования связи C–S из C–H. Такие реакции осуществляются по радикальному механизму с использованием S-аденозилметионина в качестве кофермента [54].

S12 – консервативный элемент рибосомы, а остаток Asp88 найден у всех известных гомологов S12 – в бактериях, археях и эукариотах (хотя модификация наблюдается не всегда). Asp88 располагается рядом с функциональным центром рибосомы. Попытки получить клетки *E. coli* с мутацией по этой аминокислоте не дали положительного результата. Все это указывает на важность Asp88 для функционирования рибосомы.

Все известные до RimO метилтиотрансферазы посттранскрипционно модифицируют РНК, RimO – первый изученный фермент этого семейства, мишенью которого служит белок. В *E. coli* помимо RimO обнаружена только одна метилтиотрансфераза, MiaB, модифицирующая тРНК. Аминокислотные последовательности этих двух белков характеризуются сильным сходством [53]. В частности, обе содержат мотив SxxxSxxC, канонический для всего семейства метилтиотрансфераз.

Метилтиолирование белка S12 осуществляется по радикальному механизму (рис. 8). На первом этапе разрывается связь C–S в S-аденозилметионине с образованием свободного метионина и 5'-дезоксаденозил-радикала. Затем этот радикал отнимает атом водорода у β-атома углерода Asp88. После этого образуется тиоэфир, который на последней стадии метилируется. Таким образом, для модификации одной молекулы белка S12 требуются две молекулы S-аденозилметионина [55].

Метилирование на последней стадии также происходит с помощью фермента RimO. Это значит,

что RimO является метилтрансферазой, хотя консервативные S-аденозилметионинсвязывающие мотивы, характерные для ферментов этого семейства, в нем не найдены [56].

Спектроскопически установлено, что в состав RimO входят два кластера [4Fe-4S] (рис. 9). Первый координирован остатками Cys150, Cys154 и Cys157 (консервативный SxxxSxxC-мотив), второй – остатками Cys17, Cys53 и Cys82. Предполагается, что первый кластер участвует в образовании 5'-дезоксаденозил-радикала, а второй служит источником атома серы для образования тиоэфира [56].

RimO содержит так называемый TRAM-домен, который у MiaB служит для связывания РНК [53]. Это может указывать на то, что RimO модифицирует белок S12 в составе рибосомы. Действительно, экспериментально подтверждено, что *in vivo* RimO метилтиолирует остаток Asp88 белка S12, который входит в состав малой субчастицы [57]. Ранее было установлено, что *in vitro* рекомбинантный RimO из *E. coli* и *Thermatoga maritima* может модифицировать синтетический пептидный субстрат, который имитирует петлю, содержащую остаток Asp88, но с очень низкой эффективностью [58].

Недавно показали, что в модификации белка S12 принимает участие не только RimO, но и консервативный белок YcaO, функция которого ранее не была известна. Нокаут гена *ycaO* приводит к практически полному подавлению метилтиолирующей активности RimO. Кроме того, транскриптомный анализ штаммов с делецией генов *rimO* и *ycaO* указывает на перекрывание транскрипционных фенотипов, что говорит о функциональном родстве RimO и YcaO. Белок YcaO связывается с малой субчастицей и, возможно, выполняет функцию шаперона, облегчая образование фермент-субстратного комплекса [57].

Следует упомянуть, что после метилтиолирования остатка аспарагиновой кислоты появляется новый хиральный центр (β-атом углерода), но его конфигурация до сих пор не установлена.

Белок S12 состоит из глобулярного домена, расположенного рядом с А-участком в декодирующем

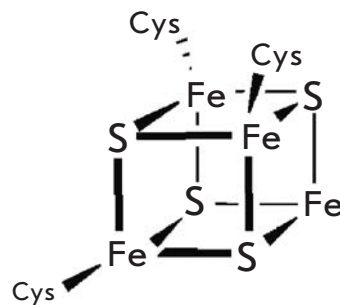


Рис. 9. Кластер [4Fe-4S], координированный остатками цистеина, в структуре RimO [56].

центре, и длинного стержнеобразного отростка, который закрепляет белок на малой субчастице. S12 – единственный белок, находящийся на поверхности соприкосновения большой и малой субчастиц. Модифицированный остаток располагается вблизи декодирующего центра, но не образует прямых контактов ни с мРНК, ни с тРНК. Он погружен в карман, образованный двумя петлями: первая формируется из нуклеотидов 522–528 16S рРНК, вторая – из аминокислотных остатков 44–51 самого S12.

Функция модификации S12 до сих пор не выяснена. Известно, что мутации в соседних остатках (Lys87, Leu89, Pro90, Gly91 и Arg93) приводят к появлению устойчивости к стрептомицину или зависимости от него [53]. Также известно, что белок S12 принимает участие в самопроизвольной транслокации рибосомы (не зависящей от EF-G и GTP), а мутация в соседнем 87-м аминокислотном остатке нарушает эту функцию [59]. Тем не менее, в случае мутации в гене *rimO* упомянутые фенотипические изменения отсутствуют. Единственное отличие такого мутанта от штамма дикого типа – немного сниженная скорость роста [53].

МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКА S6

Рибосомный белок S6 имеет уникальную разновидность посттрансляционной модификации. На его С-конце располагаются от двух до шести остатков глутаминовой кислоты (...ADDAEAGDSEE(E)₀₋₄) [60, 61]. Из них в гене (*rpsF*) закодированы только первые два (...ADDAEAGDSEE) [62], остальные добавляются посттрансляционно. Модификация происходит ступенчато, остатки глутаминовой кислоты добавляются по одной [63].

Получен мутантный штамм, в котором не наблюдается гетерогенности С-конца белка S6 и содержатся только два остатка глутаминовой кислоты. С помо-

щью этого штамма обнаружен ген *rimK*, отвечающий за эту модификацию [64]. Этот ген кодирует фермент с молекулярной массой 31.5 кДа, который узнает белок S6 и добавляет дополнительные остатки на его С-конец. В случае мутации в гене *rpsF*, приводящей к замене предпоследнего остатка глутаминовой кислоты на лизин, посттрансляционной модификации белка S6 не наблюдается [64]. Это означает, что RimK узнает С-концевой участок белка S6 дикого типа. В некоторых мутантных штаммах RimK добавляет к S6 больше четырех остатков глутаминовой кислоты, однако причины этого не выяснены [65].

Установлено, что в условиях, когда не происходит сборка рибосомы (в облученных ультрафиолетом клетках), S6 не подвергается модификации [66]. Биоинформатическими методами в RimK найден РНК-связывающий мотив [67]. Эти данные могут указывать на то, что модификация происходит во время или после встраивания белка S6 в рибосому.

Белок S6 располагается в центральном домене малой субчастицы рибосомы. Взаимодействуя с белками S18, S8 и S15, он предохраняет 16S рРНК от атаки эндонуклеаз. С-Концевые аминокислотные остатки S6 выступают наружу и не видны в кристаллической структуре.

S6 – самый кислый белок 30S субчастицы (pI = 4.8), а наблюдаемая посттрансляционная модификация делает его кислотность еще более высокой. Функция этой модификации не выяснена, однако это первый известный случай посттрансляционного добавления аминокислотных остатков. ●

*Работа поддержана Российским фондом
фундаментальных исследований (грант 10-04-
01345-а), Федеральной программой «Кадры»
НК29П П800, грантом HFSP RGY 0088/2008,
Программой Московского университета ПНР 5.13.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Arnold R.J., Reilly J.P. // *Anal. Biochem.* 1999. V. 269. P. 105–112.
2. Ben-Bassat A., Bauer K., Chang S.Y., Myambo K., Boosman A., Chang S. // *J. Bacteriol.* 1987. V. 169. P. 751–757.
3. Chang F.N., Budzilowicz C. // *J. Bacteriol.* 1977. V. 131. P. 105–110.
4. Brosius J. // *Biochemistry.* 1977. V. 17. P. 501–508.
5. Eistetter A.J., Butler P.D., Traut R.R., Fanning T.G. // *FEMS Microbiol. Lett.* 1999. V. 180. P. 345–349.
6. Makarova K.S., Ponomarev V.A., Koonin E.V. // *Genome Biol.* 2001. V. 2. Research 0033.
7. Gabriel S.E., Helmann J.D. // *J. Bacteriol.* 2009. V. 191. P. 6116–6122.
8. Plevoda B., Sherman F. // *Mol. Microbiol.* 2007. V. 65. P. 590–606.
9. Chang C.N., Chang N. // *Biochemistry.* 1975. V. 14. P. 468–477.
10. Dognin M.J., Wittmann-Liebold B. // *Eur. J. Biochem.* 1980. V. 112. P. 131–151.
11. Chang F.N., Cohen L.B., Navickas I.J., Chang C.N. // *Biochemistry.* 1975. V. 14. P. 4994–4998.
12. Colson C., Lhoest J., Urlings C. // *Mol. Gen. Genet.* 1979. V. 169. P. 245–250.
13. Demirci H., Gregory S.T., Dahlberg A.E., Jogle G. // *EMBO J.* 2007. V. 26. P. 567–577.
14. Demirci H., Gregory S.T., Dahlberg A.E., Jogle G. // *Structure.* 2008. V. 16. P. 1059–1066.
15. Agrawal R.K., Linde J., Sengupta J., Nierhaus K.H., Frank J. // *J. Mol. Biol.* 2001. V. 311. P. 777–787.
16. Cameron D.M., Thompson J., March P.E., Dahlberg A.E. // *J. Mol. Biol.* 2002. V. 319. P. 27–35.

17. Valle M., Zavialov A., Li W., Stagg S.M., Sengupta J., Nielsen R.C., Nissen P., Harvey S.C., Ehrenberg M., Frank J. // *Nat. Struct. Biol.* 2003. V. 10. P. 899–906.
18. Vanet A., Plumbridge J.A., Guerin M.F., Alix J.H. // *Mol. Microbiol.* 1994. V. 14. P. 947–958.
19. Colson C., Smith H.O. // *Mol. Gen. Genet.* 1977. V. 154. P. 167–173.
20. Lhoest J., Colson C. // *Mol. Gen. Genet.* 1977. V. 154. P. 175–180.
21. Muranova T.A., Muranov A.V., Markova L.F., Ovchinnikov Y.A. // *FEBS Lett.* 1978. V. 96. P. 301–305.
22. Lhoest J., Colson C. // *Eur. J. Biochem.* 1981. V. 121. P. 33–37.
23. Heurgue-Hamard V., Champ S., Engstrom A., Ehrenberg M., Buckingham R.H. // *EMBO J.* 2002. V. 21. P. 769–778.
24. Kaczanowska M., Ryden-Aulin M. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2007. V. 71. P. 477–494.
25. Chen R., Chen-Schmeisser U. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977. V. 74. P. 4905–4908.
26. David C.L., Keener J., Aswad D.W. // *J. Bacteriol.* 1999. V. 181. P. 2872–2877.
27. Chang F.N. // *J. Bacteriol.* 1978. V. 135. P. 1165–1166.
28. Gudkov A.T. // *FEBS Lett.* 1997. V. 407. P. 253–256.
29. Brosius J., Chen R. // *FEBS Lett.* 1976. V. 68. P. 105–109.
30. Chang C.N., Schwartz M., Chang F.N. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1976. V. 73. P. 233–239.
31. Polevoda B., Sherman F. // *Genome Biol.* 2002. V. 3. Review 0006.
32. Vetting M.W., Bareich D.C., Yu M., Blanchard J.S. // *Protein. Sci.* 2008. V. 17. P. 1781–1790.
33. Miao L., Fang H., Li Y., Chen H. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. V. 357. P. 641–647.
34. Wittmann-Liebold B., Greuer B. // *FEBS Lett.* 1978. V. 95. P. 91–98.
35. Janda I., Kitakawa M., Isono K. // *Mol. Gen. Genet.* 1985. V. 201. P. 433–436.
36. Yoshikawa A., Isono S., Sheback A., Isono K. // *Mol. Gen. Genet.* 1987. V. 209. P. 481–488.
37. Poot R.A., Jeeninga R.E., Pleij C.W., van Duin J. // *FEBS Lett.* 1997. V. 401. P. 175–179.
38. Cumberlidge A.G., Isono K. // *J. Mol. Biol.* 1979. V. 131. P. 169–189.
39. Roy-Chaudhuri B., Kirthi N., Kelley T., Culver G.M. // *Mol. Microbiol.* 2008. V. 68. P. 1547–1559.
40. White-Ziegler C.A., Black A.M., Eliades S.H., Young S., Porter K. // *J. Bacteriol.* 2002. V. 184. P. 4334–4342.
41. Yaguchi M. // *FEBS Lett.* 1975. V. 59. P. 217–220.
42. Isono K., Isono S. // *Mol. Gen. Genet.* 1980. V. 177. P. 645–651.
43. Recht M.I., Williamson J.R. // *J. Mol. Biol.* 2001. V. 313. P. 35–48.
44. Terhorst C., Moller W., Laursen R., Wittmann-Liebold B. // *Eur. J. Biochem.* 1973. V. 34. P. 138–152.
45. Tanaka S., Matsushita Y., Yoshikawa A., Isono K. // *Mol. Gen. Genet.* 1989. V. 217. P. 289–293.
46. Isono S., Isono K. // *Mol. Gen. Genet.* 1981. V. 183. P. 473–477.
47. Ramagopal S., Subramanian A.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1974. V. 71. P. 2136–2140.
48. Gordiyenko Y., Deroo S., Zhou M., Videler H., Robinson C.V. // *J. Mol. Biol.* 2008. V. 380. P. 404–414.
49. Vetting M.W., de Carvalho L.P., Roderick S.L., Blanchard J.S. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 22108–22114.
50. Funatsu G., Yaguchi M., Wittmann-Liebold B. // *FEBS Lett.* 1977. V. 73. P. 12–17.
51. Post L.E., Nomura M. // *J. Biol. Chem.* 1980. V. 255. P. 4660–4666.
52. Kowalak J.A., Walsh K.A. // *Protein. Sci.* 1996. V. 5. P. 1625–1632.
53. Anton B.P., Saleh L., Benner J.S., Raleigh E.A., Kasif S., Roberts R.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. P. 1826–1831.
54. Booker S.J., Cicchillo R.M., Grove T.L. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2007. V. 11. P. 543–552.
55. Fontecave M., Mulliez E., Atta M. // *Chem. Biol.* 2008. V. 15. P. 209–210.
56. Lee K.H., Saleh L., Anton B.P., Madinger C.L., Benner J.S., Iwig D.F., Roberts R.J., Krebs C., Booker S.J. // *Biochemistry.* 2009. V. 48. P. 10162–10174.
57. Strader M.B., Costantino N., Elkins C.A., Chen C.Y., Patel I., Makusky A.J., Choy J.S., Court D.L., Markey S.P., Kowalak J.A. // *Mol. Cell. Proteomics.* 2011. V. 10. M110.005199.
58. Arragain S., Garcia-Serres R., Blondin G., Douki T., Clemancey M., Latour J.M., Forouhar F., Neely H., Montelione G.T., Hunt J.F., et al. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. № 8. P. 5792–5801.
59. Asatryan L.S., Spirin A.S. // *Mol. Gen. Genet.* 1975. V. 138. P. 315–321.
60. Hitz H., Schafer D., Wittmann-Liebold B. // *FEBS Lett.* 1975. V. 56. P. 259–262.
61. Hitz H., Schäfer D., Wittmann-Liebold B. // *Eur. J. Biochem.* 1977. V. 75. P. 497–512.
62. Schnier J., Kitakawa M., Isono K. // *Mol. Gen. Genet.* 1986. V. 204. P. 126–132.
63. Reeh S., Pedersen S. // *Mol. Gen. Genet.* 1979. V. 173. P. 183–187.
64. Kang W.K., Icho T., Isono S., Kitakawa M., Isono K. // *Mol. Gen. Genet.* 1989. V. 217. P. 281–288.
65. Kade B., Dabbs E.R., Wittmann-Liebold B. // *FEBS Lett.* 1980. V. 121. P. 313–316.
66. Kitakawa M., Blumenthal L., Isono K. // *Mol. Gen. Genet.* 1980. V. 180. P. 343–349.
67. Koonin E.V., Bork P., Sander C. // *Nucl. Acids Res.* 1994. V. 22. P. 2166–2167.

УДК 57.083:546.59

Золотые наночастицы в биологии и медицине: достижения последних лет и перспективы

Л. А. Дыкман¹, Н. Г. Хлебцов^{1,2*}¹ Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, 410049, Саратов, просп. Энтузиастов, 13² Саратовский государственный университет, 410012, Саратов, ул. Астраханская, 83

*E-mail: khlebtsov@ibppm.sgu.ru

Поступила в редакцию 21.02.2011 г.

РЕФЕРАТ Функционализированные золотые наночастицы с контролируемыми геометрическими и оптическими свойствами являются объектом интенсивного изучения и применения в биомедицинских целях, включая геномику, биосенсорику, иммуноанализ, клиническую химию, лазерную фототерапию раковых клеток и опухолей, адресную доставку лекарственных средств, ДНК и антигенов, оптический биоимиджинг и мониторинг клеток и тканей с применением современных систем регистрации. В обзоре рассмотрены актуальные проблемы и результаты применения золотых наночастиц различного размера, формы и структуры в биомедицине. Основное внимание уделено применению конъюгатов золотых наночастиц с различными молекулами-зондами в биомедицинской диагностике, фототермической и фотодинамической терапии, в качестве носителей целевых молекул, а также их иммунологическим и токсикологическим свойствам. Из-за огромного объема информации и высокой скорости обновления данных 2/3 списка цитированных работ (заведомо ограниченного 250 ссылками) – это публикации последних пяти лет.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА золотые наночастицы, плазмонный резонанс, биосенсоры, медицинская диагностика, фототермическая терапия, адресная доставка лекарств, нанотоксикология.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ЗНЧ – золотые наночастицы; ПФТТ – плазмонная фототермическая терапия; ПЭГ – полиэтиленгликоль; ПЭМ, РЭМ – просвечивающая и растровая электронная микроскопия; ФДТ – фотодинамическая терапия; ФНО – фактор некроза опухоли; ЦТАБ – цетилтриметиламмонийбромид; SPIA (sol particle immunoassay) – иммуноанализ на частицах золя.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение

1. Золотые наночастицы в диагностике
 - 1.1. Методы визуализации и биоимиджинга
 - 1.2. Аналитические методы диагностики
 - 1.2.1. Гомофазные методы
 - 1.2.2. Дот-иммуноанализ
 - 1.2.3. Иммунохроматография
 - 1.2.4. Плазмонно-резонансные биосенсоры
2. Золотые наночастицы в терапии
 - 2.1. Фототермическая терапия с использованием золотых наночастиц
 - 2.2. Фотодинамическая терапия с использованием золотых наночастиц
 - 2.3. Использование золотых наночастиц как терапевтического средства
3. Золотые наночастицы – носители лекарственных средств
4. Иммунологические свойства золотых наночастиц

5. Биораспределение и токсичность золотых наночастиц

Заключение

ВВЕДЕНИЕ

Золото – один из первых открытых человеком металлов, история изучения и применения которого насчитывает, как минимум, несколько тысяч лет. Первые сведения о коллоидном золоте можно найти в трактатах китайских, арабских и индийских ученых, которые уже в V–IV веках до нашей эры получали коллоидное золото и использовали его, в частности, в лечебных целях (китайский «золотой раствор» – цзинь е, чин-тау, индийское «жидкое золото» – Kushta Tila Kalan, Makaradhwaaja). В средние века в Европе коллоидное золото изучали и применяли в лабораториях алхимиков. Так Парацельс писал о терапевтических свойствах квинтэссенции золота –

«*quinta essentia auri*», полученной им восстановлением хлорида золота спиртовыми или масляными растительными экстрактами. Он использовал «питьевое золото» при ряде психических заболеваний и сифилисе. Его современник Джованни Андреа применял «*aurum potabile*» при проказе, язве, эпилепсии, диарее. Врач французского короля Людовика XIII алхимик Давид де Плани-Кампи в 1583 г. рекомендовал свой «эликсир долголетия» – коллоидный раствор золота в воде. Первая из дошедших до нас книг, посвященных коллоидному золоту, была опубликована в 1618 г. философом и доктором медицины Франциском Антониом [1]. В ней содержались сведения о получении коллоидного золота и его применении в медицине, включая практические советы.

Несмотря на многовековую историю, «революция в иммунохимии», связанная с использованием золотых наночастиц (ЗНЧ) в биологических исследованиях, произошла в 1971 г., когда британские исследователи Фолк и Тейлор [2] описали способ конъюгации антител с коллоидным золотом для прямой электронно-микроскопической визуализации поверхностных антигенов сальмонелл. С этой работы начинается история применения биоспецифических маркеров – конъюгатов коллоидного золота с иммуноглобулинами и другими молекулами в различных областях биологии и медицины. За прошедшие 40 лет опубликовано огромное количество работ, посвященных применению функционализированных наночастиц – конъюгатов с узнающими биомолекулами (антителами, лектинами, ферментами, аптамерами и др.) в биохимии, микробиологии, иммунологии, цитологии, физиологии растений, морфологии и т.д.

Спектр использования ЗНЧ в современных медико-биологических исследованиях необычайно широк. Он включает, в частности, геномику, биосенсорику, иммуноанализ, клиническую химию, детекцию и фототермолит микроорганизмов и раковых клеток, адресную доставку лекарственных средств, ДНК и антигенов, оптический биоимиджинг и мониторинг клеток и тканей с применением современных систем регистрации. Золотые наночастицы предложено применять практически во всех медицинских приложениях – диагностике, терапии, профилактике, гигиене. Обширную информацию о получении, функционализации и использовании коллоидного золота в биологии и медицине можно найти в книгах и обзорах [3–8]. Широкий спектр приложений ЗНЧ основан на их уникальных физических и химических свойствах. В частности, оптические свойства ЗНЧ определяются их плазмонным резонансом, связанным с коллективным возбуждением электронов проводимости и локализованным в широкой обла-

сти – от видимой до инфракрасной (ИК), в зависимости от размера, формы и структуры частиц [9].

Учитывая большой объем опубликованных данных и высокую скорость их обновления, цель нашего обзора состояла в обобщении результатов, полученных за последние годы в наиболее перспективных направлениях использования ЗНЧ в современных медико-биологических исследованиях.

1. ЗОЛОТЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ В ДИАГНОСТИКЕ

1.1. Методы визуализации и биоимиджинга

Золотые наночастицы активно используются для идентификации химических и биологических агентов. Исторически основным методом обнаружения биоспецифических взаимодействий посредством частиц коллоидного золота (благодаря их высокой электронной плотности) долгое время оставалась электронная микроскопия, преимущественно в просвечивающем варианте (ПЭМ). Не случайно первое трехтомное издание о применении коллоидного золота [10] в основном было посвящено именно ПЭМ с использованием ЗНЧ. Особенностью современного использования электронно-микроскопической техники является применение приборов высокого разрешения (high-resolution transmission electron microscope – HRTEM) и систем цифровой записи и обработки изображений. Основное приложение иммуноэлектронной микроскопии в современных медико-биологических исследованиях – идентификация возбудителей инфекционных заболеваний и их поверхностных антигенов [11] (рис. 1А). В этих же целях зачастую применяют сканирующую зондовую [12] (рис. 1Б),

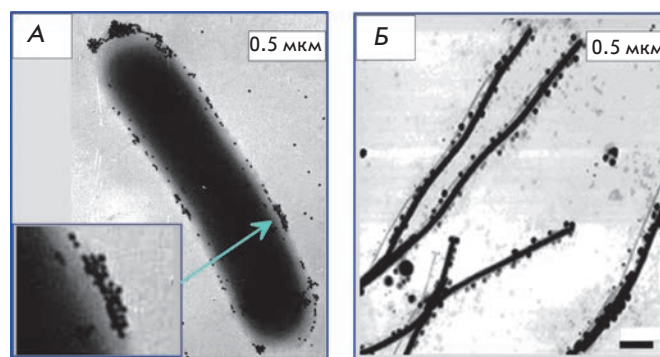


Рис. 1. ПЭМ-изображение клетки *Listeria monocytogenes*, меченной конъюгатом антител с коллоидным золотом (А), и изображение вируса табачной мозаики, меченного конъюгатом антител с коллоидным золотом, полученное методом сканирующей зондовой микроскопии (Б). Адаптировано по данным работ [11] (А) и [12] (Б).

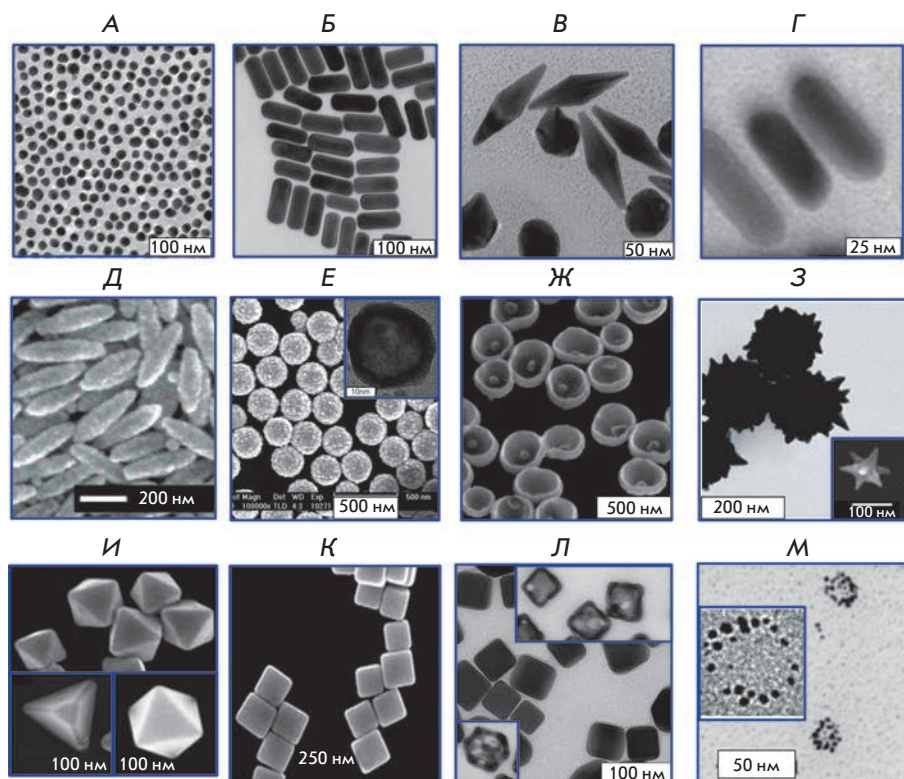


Рис. 2. Золотые плазмонно-резонансные наночастицы: 16 нм наносферы (А) [8], наностержни (Б) [15], бипирамиды (В) [16], золотые наностержни с серебряной наноболочкой (Г) [17], «нанорис» – наностержни Fe_2O_3 , покрытые золотом (Д) [18], наноболочки SiO_2/Au на ядрах двуоксида кремния (Е) [19] (на вставке показан вариант наноболочки с полым ядром [20]), наночаши с ядром на дне (Ж) [21], наноболочки SiO_2/Au с золотыми шипами («spiky nanoshells» [22], на вставке показана золотая «нанозвезда» [23]) (З), тетраэдры, октаэдры и кубооктаэдры (И) [24], нанокубики (К) [24], серебряные нанокубики и полученные из них золото-серебряные наноклетки (на вставках) (Л) [25], наножерелья (М). Рисунки воспроизведены или адаптированы по данным цитированных публикаций с разрешения The Royal Society of Chemistry (<http://dx.doi.org/10.1039/b711490g>, <http://dx.doi.org/10.1039/b925102b>, <http://dx.doi.org/10.1039/c0cs00018c>) и The American Chemical Society.

сканирующую электронную [13] и флуоресцентную [14] микроскопию.

Кроме «классического» коллоидного золота с квазисферическими частицами – наносферами – в качестве меток для микроскопических исследований в последние годы стали использовать частицы несферической цилиндрической формы – наностержни, а также наноболочки, наноклетки, нанозвезды и др. типы частиц, объединенные термином плазмонно-резонансные частицы благородных металлов [8] (рис. 2).

Большую популярность в медицинских и биологических исследованиях в последние годы приобрели также методы визуализации объектов с использованием ЗНЧ и оптической микроскопии [27] и, в частности, конфокальной лазерной микроскопии. Конфокальная микроскопия представляет собой метод обнаружения микрообъектов с помощью оптической системы, которая обеспечивает регистрацию светового излучения только от объектов, расположенных в ее фокальной плоскости, что позволяет сканировать образцы по высоте и в итоге создавать их объемные изображения путем наложения сканограмм. Использование в этом методе ЗНЧ и их конъюгатов

с антителами позволяет в реальном времени отслеживать проникновение золота на уровне одной частицы в живые клетки (например, раковые) и даже оценить их количество [28].

Конфокальные изображения могут быть получены, например, с детектированием излучения флуоресценции (конфокальная флуоресцентная микроскопия) или резонансного упругого или двухфотонного (мультифотонного) рассеяния света плазмонными наночастицами (конфокальная микроскопия резонансного рассеяния или двухфотонной люминесценции). Эти методики основаны на обнаружении микрообъектов с помощью оптического микроскопа, в котором люминесценция объекта возбуждается благодаря одновременному поглощению двух (или более) фотонов, энергия каждого из которых меньше энергии, необходимой для возбуждения флуоресценции. Основное преимущество данного метода состоит в повышении контраста за счет сильного уменьшения фонового сигнала. Использование двухфотонной люминесценции золотых наночастиц позволяет визуализовать, в частности, онкомаркеры на поверхности или внутри клетки [29, 30]. На рис. 3А приведен пример комбинированного биоимиджинга раковой клетки с использо-

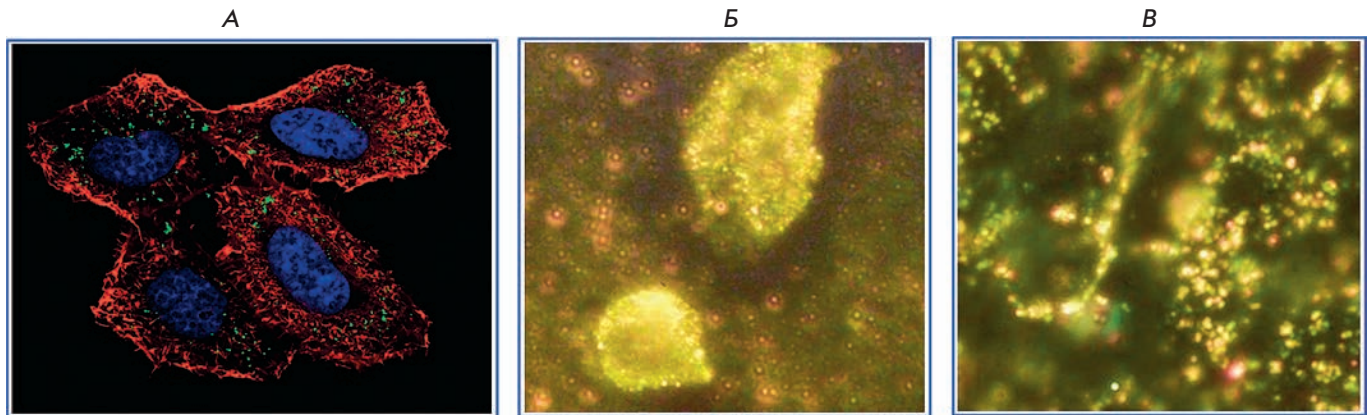


Рис. 3. А – Конфокальное изображение клеток HeLa в присутствии золотых наночастиц. Ядра окрашены реактивом Hoechst 33258 (синий цвет), актиновый цитоскелет – фаллоидином, меченным Alexa Fluor 488 (красный), золотые наночастицы (зеленый) выявлены методом двухфотонной люминесценции [30]. Темнопольное микроскопическое изображение опухолевых (Б) и здоровых (В) клеток с использованием конъюгатов золотых наночастиц с антителами к рецептору эпидермального фактора роста [31]. Адаптировано из цитируемых работ с разрешения The American Chemical Society.

ванием адсорбционных, флуоресцентных и люминесцентных плазмонно-резонансных меток.

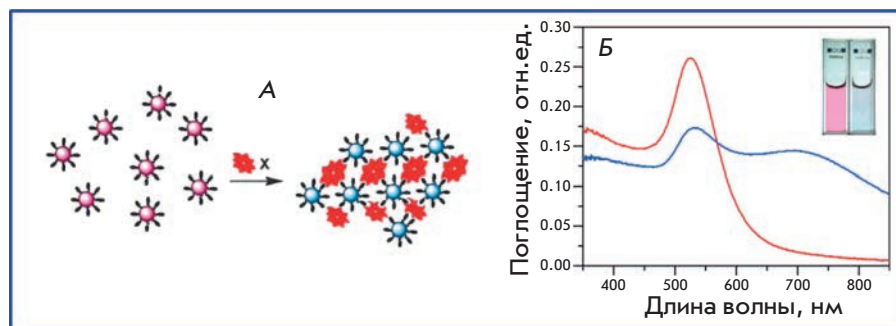
Одним из наиболее популярных методов биоимиджинга с использованием ЗНЧ остается микроскопия темного поля, основанная на рассеянии света микроскопическими объектами (темнопольная микроскопия резонансного рассеяния), в том числе и теми, размеры которых меньше предела разрешения светового микроскопа (рис. 3Б,В). При темнопольной микроскопии в объектив попадает только свет, рассеянный объектом при боковом освещении (аналогично эффекту Тиндаля), поэтому рассеивающий объект ярко светится на темном фоне. Золотые наночастицы имеют большие возможности для выявления биоспецифических взаимодействий с использованием световой микроскопии темного поля по сравнению с флуоресцентными метками [8], так как сечение рассеяния частицы на 3–5 порядков превышает сечение флуоресценции одной молекулы. Этот принцип был впервые использован американскими исследователями из лаборатории М. Эль-Сайеда [31] в новом методе простой и надежной диагностики онкологических заболеваний с помощью ЗНЧ. Метод основан на связывании конъюгатов, специфичных к опухолевым антигенам антител и ЗНЧ, преимущественно с поверхностью раковых клеток, а не здоровых клеток. Таким образом, с помощью метода темнопольной микроскопии резонансного рассеяния можно «картографировать» опухоль с точностью до нескольких клеток (рис. 3Б,В). В дальнейшем с этой целью использовали золотые наностержни [32], нанооболочки [33], нанозвезды [34] и наноклетки [35].

Наноклетки представляют собой сравнительно новый класс наночастиц, получаемых методом гальванического замещения на шаблонах из серебряных нанокубиков. В этой реакции три атома серебра заменяются на один атом золота, так что постепенно формируются различные пористые сплавные золото-серебряные структуры, называемые «нанокоробками» и «наноклетками» (nanoboxes и nanocages) [35]. В процессе формирования таких частиц плазмонный резонанс смещается от 430–440 нм у кубиков до 700–900 нм у наноклеток.

Использование несферических и/или неоднородных частиц, а также самосборных монослоев наночастиц или островковых пленок открывает новые возможности для повышенной чувствительности обнаружения бимолекулярного связывания на или около поверхности наноструктур. Принцип усиления сигнала биомолекулярного связывания основан на сильных локальных электромагнитных полях, возникающих около наночастиц с острыми участками поверхности или в узких (порядка или менее нанометра) зазорах между двумя наночастицами. Это обуславливает повышенную чувствительность плазмонного резонанса к локальному диэлектрическому окружению и высокую интенсивность рассеяния по сравнению с эквивалентными сферами. Поэтому такие наноструктуры имеют многообещающие перспективы использования в биомедицинских диагностических целях с применением световой микроскопии темного поля [36].

Золотые наночастицы в темнопольной микроскопии резонансного рассеяния используют для де-

Рис. 4. Иммуноанализ на частицах золя: схема агрегации конъюгатов в результате связывания с молекулами-мишенями (А) и соответствующие изменения спектров и цвета золя (Б). Адаптировано по данным [52] с разрешения The American Chemical Society.



текции микробных клеток и их метаболитов [37], биоимиджинга опухолевых клеток [38] и выявления рецепторов на их поверхности [39], для изучения процессов эндоцитоза [40]. В большинстве биомедицинских приложений эффективность мечения клеток конъюгатами оценивается на качественном уровне. Одно из немногих исключений представляет метод количественной оценки эффективности мечения клеток золотыми наночастицами [41], примененный для мечения клеток почек эмбриона свиньи конъюгатами золотых наноболочек.

Кроме перечисленных способов регистрации биоспецифических взаимодействий с помощью различных вариантов оптической микроскопии и ЗНЧ, в настоящее время активно развиваются и другие современные методы детекции и биоимиджинга, которые можно объединить под общим названием – «методы биофотоники» [9]. Биофотоника объединяет все исследования, связанные с взаимодействием света с биологическими клетками и тканями. К методам биофотоники можно отнести оптическую когерентную томографию [42], рентгеновскую и магниторезонансную томографию [43, 44], фотоакустическую микроскопию [45] и томографию [46], флуоресцентную корреляционную микроскопию [47] и т.п. В этих методах также с успехом используются золотые наночастицы различных размеров и форм. Особо перспективными, на наш взгляд, методы биофотоники с применением золотых несферических наночастиц могут оказаться для биоимиджинга *in vivo* [48]. Кроме того, следует отметить важность нового класса конъюгатов ЗНЧ с узнающими конструкциями на основе модуля «барназа–барстар» [49].

1.2. Аналитические методы диагностики

1.2.1. Гомофазные методы. С 80-х годов прошлого века конъюгаты коллоидного золота с узнающими биомакромолекулами начали применять в различных аналитических методах клинической диагностики. В 1980 г. Дж. Лойверинг и соавт. [50] предложили новый метод, названный ими иммуноанализ на ча-

стицах золя (sol particle immunoassay, SPIA). Этот метод основан на двух принципах: 1) цвет и спектр поглощения золя мало изменяются при адсорбции биополимеров на индивидуальных частицах [51]; 2) при сближении частиц на расстояние менее 0.1 их диаметра красный цвет золя изменяется на пурпурный, а спектр поглощения уширяется и сдвигается в красную область [51]. Эти изменения спектра поглощения легко детектируются спектрофотометрически или визуально (рис. 4, [52]).

Оптимизированный вариант метода (с использованием частиц золота более крупных размеров и моноклональных антител к различным сайтам антигена) применили для выявления хорионического гонадотропина в моче беременных [53]. На основе этих разработок фирмой «Chefaro» (Нидерланды) был выпущен набор Discretest™ для внебольничной ранней диагностики беременности. Наборы для иммуноколориметрического определения ревматоидного фактора и стрептолизина выпускает фирма «ПЛИВА-Лахема» (Чехия).

В дальнейшем этот метод применяли для иммуноанализа антигенов шистозом, рубелл и количественного определения иммуноглобулинов (см. ссылки в [5]), для определения тромбина (с использованием аптамеров) [54] и глюкозы [55], прямого выявления раковых клеток [56] и клеток лептоспир в моче [57], определения маркеров болезни Альцгеймера [58] и протеазной активности [59]. Одновременное использование конъюгатов золотых наностержней и наносфер с антителами для детекции опухолевых антигенов описано в работе [60]. Опубликованы данные [61] об определении вируса гепатита В в крови с помощью золотых наностержней, конъюгированных со специфичными антителами.

Все варианты метода SPIA оказались весьма простыми в исполнении и при этом высокочувствительными и специфичными. Однако в ряде случаев, несмотря на заведомую комплементарность пары, агрегация не происходила, цвет раствора и соответственно спектры поглощения не изменялись или изменялись незначительно. Опубликована модель обра-

зования второго белкового слоя на золотых частицах без потери агрегативной устойчивости золя [62]. Изменения спектров, обусловленные адсорбцией биополимеров на поверхности золотых наночастиц, сравнительно малы. Однако даже такие незначительные изменения спектров поглощения, вызванные изменением структуры биополимерного слоя (и, в частности, его среднего показателя преломления) около поверхности ЗНЧ, можно зарегистрировать и использовать для количественного анализа в биологических приложениях [63].

Для повышения чувствительности аналитической гомофазной реакции используют разнообразные оптические методы, включая различные варианты ИК-Фурье [64] и UV-vis-спектроскопии поглощения или отклонения луча (см. ссылки в [5]), гиперрелеевское [65], дифференциальное статическое [51] и динамическое [60] рассеяние света, а также поверхностно-усиленное комбинационное рассеяние [66].

Новый вариант описываемого метода предложен Миркиным и соавт. [67] для колориметрической детекции ДНК. В настоящее время колориметрическое определение ДНК включает две стратегии: (1) использование конъюгатов ЗНЧ с тиол-модифицированными одноцепочечными ДНК [67–71]; (2) использование немодифицированных ЗНЧ [72, 73]. Первая стратегия основана на агрегации конъюгатов 10–30 нм ЗНЧ с тиол-модифицированными одноцепочечными ДНК-зондами при внесении в систему полинуклеотидов-мишеней. При этом применяют зонды двух типов, комплементарные двум концевым участкам мишеней. Гибридизация мишеней и зондов приводит к формированию агрегатов ЗНЧ, что сопровождается изменением спектра поглощения раствора и легко выявляется визуально, фотометрически [74] или методом динамического рассеяния света [71]. В рамках первой стратегии Маеда и соавт. [75] использовали диагностическую систему, основанную на агрегации ЗНЧ, модифицированных зондами одного типа, при внесении в раствор ДНК-мишеней в условиях высокой ионной силы. В отличие от них [75], Бапטיста и соавт. [70] разработали метод, основанный на повышенной стабильности конъюгатов при добавлении комплементарных мишеней даже в условиях высокой ионной силы (2 М NaCl) и наблюдали агрегацию некомплементарных мишеней. Кажущиеся противоречия между двумя подходами были объяснены [76] различием в поверхностной плотности функционализации.

Вторая стратегия [72] основана на том, что при высокой ионной силе одноцепочечная ДНК защищает немодифицированные ЗНЧ от агрегации, в то время как формирование дуплексов при гибридизации не может стабилизировать систему. Этот подход ис-

пользован для определения вируса гепатита С [77]. Недавно Ся и соавт. [78] описали новый вариант второй стратегии, в котором используются одноцепочечные ДНК, немодифицированные ЗНЧ и катионный полиэлектролит. Этот же подход оказался пригодным для определения широкого спектра мишеней, включая пептиды, аминокислоты, пестициды, антибиотики и тяжелые металлы. В отличие от методик с обычными ЗНЧ, Хэ и соавт. [73] предложили метод определения ДНК вируса HIV-1 U5 с использованием стабилизированных цетилтриметиламмонийбромидом (ЦТАБ) наностержней и метода светорассеяния с пределом детекции (100 пМ). В оптимизированном варианте с использованием спектроскопии поглощения [79] предел детекции был снижен до 0.1 пМ. Недавно показали, что для обнаружения ДНК-мишеней можно также использовать покрытые ЦТАБ положительно заряженные ЗНЧ в комбинации с методами спектроскопии и динамического рассеяния [15].

Перечисленные варианты метода агрегации частиц золя за счет реакции гибридизации использовали для определения ДНК микобактерий [70], стафилококков [80], стрептококков [81] и хламидий [82] в клинических образцах.

Способность золотых частиц при их взаимодействии с белками агрегировать с изменением цвета раствора послужила основой для количественного метода колориметрического определения белков [83]. Предложен новый вариант метода SPIA с использованием микротитровальных планшетов и микропланшетного спектрофотометра, а также с применением в качестве специфического агента, выявляющего белки, конъюгата трипсина с коллоидным золотом [84].

1.2.2. Дот-иммуноанализ. На ранних этапах развития иммуноанализа предпочтение отдавалось жидкофазным методикам, в которых осаждали связавшиеся антитела или удаляли несвязавшийся антиген адсорбцией с помощью активированного угля, покрытого декстраном. В настоящее время наиболее распространены твердофазные методики (впервые использованные в радиоиммуноанализе белков), поскольку они позволяют существенно упростить проведение анализа и уменьшить фоновый сигнал. Наибольшее распространение среди твердофазных носителей получили микротитровальные полистирольные планшеты и нитроцеллюлозные фильтры.

В качестве метки в мембранных тестах (дот- и блот-анализы) широко применяют радиоактивные изотопы (^{125}I , ^{14}C , ^3H) и ферменты (пероксидазу, щелочную фосфатазу и др.). В 1984 г. независимо опубликовали четыре работы [85–88], в которых меткой для твердофазного иммуноанализа служило кол-

Таблица 1. Пределы чувствительности иммунодот-блот-методов на нитроцеллюлозных фильтрах с использованием различных меток (согласно [89])

Метка	Предел чувствительности, пг белка / фракция
^{125}I	5
Пероксидаза хрена	10
Щелочная фосфатаза	1
Коллоидное золото	1
Коллоидное золото + серебро	0.1
Флуоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ)	1000

лоидное золото. Использование конъюгатов ЗНЧ в твердофазном анализе основано на том, что интенсивная красная окраска золотосодержащего маркера позволяет визуально определять результаты реакции, проведенной на твердом носителе. «Иммунозолотые» методы в дот-блот-анализе превосходят прочие (например, иммуноферментный) по чувствительности (табл. 1, [89]), простоте, скорости и стоимости. Размеры ЗНЧ после соответствующей иммунохимической реакции можно увеличить с помощью реакции усиления солями серебра [90] или золота (автометаллография) [91], что существенно увеличивает границы приложения метода. Оптимизированный вариант твердофазного анализа с использованием системы денситометрирования Quantity One («Bio-Rad») обеспечивал линейный диапазон детекции от 1 пМ до 1 мкМ [92] с пределом 100 аМ и его снижением до 100 зМ усилением серебром. Следует иметь в виду, что это рекордное снижение предела детекции за счет усиления серебром достигнуто при помощи чувствительной системы денситометрирования Quantity One. Современные инструментальные методы, такие, как фототермическое отклонение зондирующего лазерного луча, вызванное нагревом локального окружения около поглощающих частиц импульсами нагревающего лазера (LISNA [93]), также обеспечивает очень широкий диапазон детекции – от трех порядков до нескольких отдельных частиц в пятне.

При специфическом окрашивании мембрану с нанесенным материалом инкубируют в растворе антител (или других биоспецифических зондов), меченных коллоидным золотом [94]. В качестве зондов при проведении «золотого» дот- или блот-анализа используют иммуноглобулины, Fab- и scFv-фрагменты

антител, белок А, лектины, ферменты, авидин или антибиотинные антитела при исследовании биотинилированных образцов, аптамеры и другие узнающие молекулы. Используют также одновременно несколько меток (например, коллоидное золото и пероксидазу или щелочную фосфатазу) для выявления различных антигенов на мембране.

Коллоидное золото в мембранных тестах применяли для диагностики паразитарных, вирусных, грибковых заболеваний, туберкулеза, мелиоидоза, сифилиса, бруцеллеза, шигеллеза, коли-инфекций, для определения групп крови, беременности на ранних сроках, дот-блот-гибридизации, выявления дифтерийного токсина, диагностики инфаркта миокарда, гепатита В (см. ссылки в [5]).

Иммунодот является одним из наиболее простых методов определения антигенов, иммобилизованных на мембранах, в некоторых случаях этот метод позволяет оценить и их количественное содержание. Чаще всего с помощью иммунодота изучают растворимые антигены [95]. Однако имеются немногочисленные работы, в которых методом дот-анализа с ферментной меткой изучали корпускулярные антигены (целые бактериальные клетки) [96]. Впервые методика дот-анализа целых бактериальных клеток с визуализацией продуктов реакции биоспецифическими маркерами – конъюгатами коллоидного золота («cell-gold immunoblotting»), использована для серотипирования почвенных азотфиксирующих микроорганизмов рода *Azospirillum* [97]. В дальнейшем этот метод применили для экспресс-диагностики кишечных инфекций [98].

Результаты применения золотых наноболочек в качестве биоспецифических меток для дот-анализа впервые были представлены в работе [99], в которой исследованы три типа золотых наноболочек с диаметром силикатного ядра 100, 140 и 180 нм и толщиной золотой оболочки примерно 15 нм. В качестве биоспецифической пары использовали нормальную кроличью сыворотку (молекулы-мишени) и антикроличьи иммуноглобулины овцы (узнающие молекулы). При использовании стандартного протокола дот-анализа на нитроцеллюлозной мембране с наночастицами коллоидного золота диаметром 15 нм в качестве меток минимально выявляемое количество кроличьих IgG составляло 15 нг. Замена конъюгатов коллоидного золота на наноболочки увеличила чувствительность анализа до 0.2 нг в случае золотых наноболочек типа 180/15 нм и до 0.4 нг в случае золотых наноболочек типа 100/15 и 140/15 нм (рис. 5). Столь заметное увеличение чувствительности дот-анализа с наноболочками по сравнению с коллоидным золотом объяснено различными оптическими свойствами частиц [100].

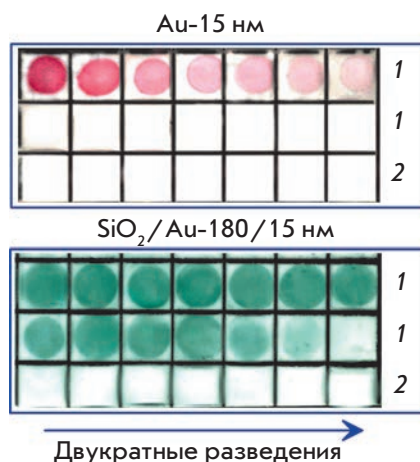


Рис. 5. Результаты дот-анализа нормальной кроличьей сыворотки (1) с использованием суспензий конъюгатов 15 нм ЗНЧ и наноболочек SiO_2/Au с диаметром ядра 180 нм с овечьими антикроличьими антителами. Количество IgG в первом квадрате верхнего ряда равно 1 мкг и уменьшается в соответствии с двукратными разведениями слева направо. Нижние ряды (2) соответствуют нанесению 10 мкг бычьего сывороточного альбумина в каждый квадрат в качестве негативного контроля. Выявляемое количество пробы равно 15 нг для 15 нм ЗНЧ и 0.2 нг для наноболочек. Адаптировано по данным [100].

Весьма перспективным кажется применение ЗНЧ при анализе больших массивов антигенов в микроматрицах (иммуночипах) [101], которые позволяют определять анализируемое вещество в 384 пробах одновременно в концентрации 60–70 нг/л или, с учетом микролитровых количеств пробы и иммунозолотого маркера, с пределом детекции менее 1 пг.

1.2.3. Иммунохроматография. Около 10 лет назад несколько зарубежных фирм организовали выпуск иммунохроматографических тест-систем для бесприборной диагностики. Благодаря высокой специфичности и чувствительности иммуноанализа эти тесты нашли широкое применение в определении наркотических соединений, токсинов, ранней диагностике беременности, скрининге особо опасных и урогенитальных инфекций. Разработаны новые методы диагностики туберкулеза, геликобактериоза, стафилококковой инфекции, гепатита В, простатита, определения беременности на ранних сроках, пестицидов, афлатоксина, диэтилстильбэстрола и цефалексина в объектах окружающей среды, а также ДНК-гибридизации (см. ссылки в [5]).

Иммунохроматографический анализ [102] основан на движении элюента вдоль мембраны (латеральная

диффузия), в результате чего на разных участках мембраны образуются специфические иммунные комплексы, выявляемые как окрашенные полосы. В качестве меток в этих системах используются ферменты, окрашенные латексы, квантовые точки [102], но в подавляющем большинстве случаев – золотые наночастицы [103].

Исследуемый образец за счет капиллярных сил мигрирует вдоль тест-полоски. Если проба содержит искомое вещество или иммунохимически близкие соединения в момент прохождения образца через абсорбирующее устройство, то происходит реакция со специфическими антителами, мечеными коллоидным золотом, которая сопровождается образованием комплекса антиген–антитело. Коллоидный препарат вступает в реакцию конкурентного связывания с антигеном, иммобилизованным в тест-зоне (как правило, при детекции низкомолекулярных соединений для иммобилизации используется конъюгат гаптена с белковым носителем). Если концентрация антигена в пробе превышает пороговый уровень, то конъюгат не обладает свободными валентностями для взаимодействия в тест-зоне, и окрашенная полоса, соответствующая образованию комплекса, не выявляется. При отсутствии в пробе определяемого вещества или его концентрация не достигает порогового уровня, антиген, иммобилизованный в тест-зоне полоски, вступает в реакцию с антителами на поверхности коллоидного золота, что приводит к появлению окрашенной полосы.

Золотые частицы с иммобилизованными антителами, непрореагировавшие с антигеном в тест-зоне полоски, при дальнейшем движении фронта жидкости связываются в контрольной зоне тест-полоски с антивидовыми антителами. Появление окрашенной полосы в контрольной зоне подтверждает правильность проведения тестирования и диагностическую активность компонентов системы. Отрицательный

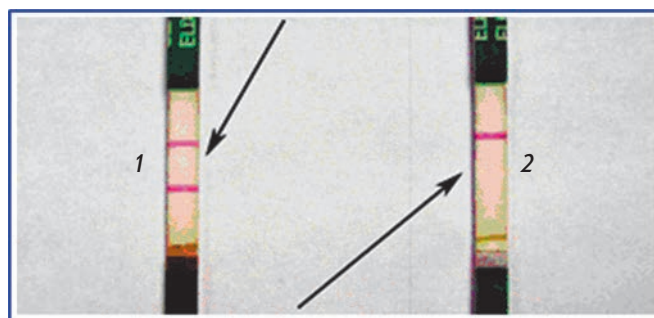


Рис. 6. Результаты иммунохроматографического анализа: 1 – отрицательный, 2 – положительный.

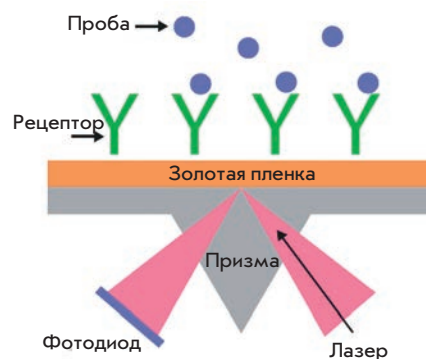
результат тестирования – появление двух окрашенных полос (в тест-зоне и контрольной зоне) – указывает на отсутствие антигена в образце или на его более низкую концентрацию по сравнению с пороговым уровнем. Положительный результат тестирования – появление одной окрашенной полосы в контрольной зоне – свидетельствует о превышении антигеном пороговой концентрации (рис. 6).

Изучение таких тест-систем показало их высокую стабильность, воспроизводимость результатов и корреляцию с альтернативными методами. Денситометрическая характеристика степени неоднородности полос дает величину 5–8%, что позволяет вполне достоверно визуально оценить результаты анализа. Эти тесты крайне просты и удобны в применении.

1.2.4. Плазмонно-резонансные биосенсоры. В последние годы наночастицы золота, серебра и их композиты широко используются как эффективные оптические детекторы биоспецифических взаимодействий [104]. В частности, резонансные оптические свойства нанометровых металлических частиц успешно применяются для разработки так называемых биочипов и биосенсоров. Различают колориметрические, рефрактометрические, электрохимические, пьезоэлектрические и др. сенсоры [102, 105, 106]. Подобные устройства представляют большой интерес для биологии (определение содержания нуклеиновых кислот, белков и метаболитов), медицины (скрининг лекарственных средств, анализ антител и антигенов, диагностика инфекционных заболеваний) и химии (экспресс-мониторинг окружающей среды, количественный анализ растворов и дисперсных систем).

Более 10 лет развивается изучение биоспецифических взаимодействий в таких системах, где ЗНЧ представлены упорядоченными структурами: самосборными (тонкие пленки) [107] или в составе полимерных матриц [108]. В этом случае используется усиление оптического сигнала от конъюгата за счет усиления возбуждающего локального поля в сформировавшемся агрегате из золотых нанокластеров. При создании биосенсорных устройств в настоящее время используются новые уникальные технологии, в частности монослойная самосборка металлических частиц (см. [109] и ссылки в этой работе), нанолитография [110], вакуумное испарение [111] и др. Принципиально важно отметить, что на оптический отклик от наночастиц или их агрегатов (особенно упорядоченных) существенно влияют размер и форма частиц [112], межчастичное расстояние [113], а также оптические свойства их локального окружения [114], что дает возможность управлять «настройкой» сенсоров. Эти свойства металлических кластеров послужили основой для создания новых многообещающих

Рис. 7. Схема детектирования молекул пробы в приборе типа **ВIAcore™** с использованием полного внутреннего отражения на грани призмы, покрытой тонкой золотой пленкой. Адаптировано по данным [106].



плазмонно-резонансных биосенсорных систем (SPR-биосенсоры), основанных на преобразовании биоспецифических взаимодействий в оптический сигнал. Теория создания и варианты практического использования подобных систем рассмотрены в обзорах [115–119].

Чувствительность, стабильность и селективность сенсора напрямую зависят от характеристик оптической системы регистрации. Наиболее популярной сенсорной системой такого рода является **ВIAcore™** [120]. Принцип измерения в планарных, призмных или зеркальных биосенсорах аналогичен принципу метода нарушенного полного внутреннего отражения, который традиционно используется для измерений толщины и показателя преломления ультратонких органических пленок на металлических (отражающих) поверхностях [105]. Возбуждение плазмонного резонанса в плоском слое золота происходит, когда поляризованный свет падает на поверхность под определенным углом. На поверхности раздела металл/диэлектрик возбуждаются электромагнитные поля, бегущие вдоль границы раздела и локализованные около нее за счет экспоненциального убывания амплитуды перпендикулярно диэлектрику с типичной длиной затухания до 200 нм (эффект полного внутреннего отражения, рис. 7). Коэффициент отражения под определенным углом на определенной длине волны света зависит от диэлектрических свойств тонкого слоя на поверхности раздела, которые определяются, в конечном счете, концентрацией молекул-мишеней в слое.

Различные типы биосенсоров с использованием ЗНЧ были разработаны для иммунодиагностики клещевого энцефалита [121], вирусов папилломы [122] и иммунодефицита [123] человека, болезни Альцгеймера [124], определения фосфорорганических веществ и пестицидов [125], антибиотиков [126], аллергенов [127], цитокинов [128], углеводов [129], иммуноглобулинов [130], выявления опухолевых [131] и бактериальных [132] клеток, определения активности клеток головного мозга [133].

Биосенсоры на основе ЗНЧ применяются не только в иммуноанализе [134], но и для детекции нуклеотидных последовательностей [67, 119]. В пионерских работах [135, 136] получены рекордные показатели чувствительности подобных сенсоров в зептомолярном диапазоне на основе детектирования спектров резонансного рассеяния от отдельных частиц. Это открыло путь к регистрации межмолекулярных взаимодействий на уровне отдельных молекул [137].

2. ЗОЛОТЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ В ТЕРАПИИ

2.1. Фототермическая терапия с использованием золотых наночастиц

Фототермическое повреждение клеток представляет собой интенсивно развиваемое перспективное направление в терапии как опухолей [138], так и инфекционных заболеваний. Суть явления такова: золотые наночастицы имеют максимум поглощения в видимой или ближней инфракрасной области и при облучении соответствующим светом сильно разогреваются. Если при этом они находятся внутри или вокруг клеток-мишеней (чего можно добиться путем конъюгации частиц золота с антителами или другими молекулами), то эти клетки погибают.

Тепловое воздействие используется в терапии опухолей с XVIII века. С этой целью применялся как локальный нагрев (с использованием микроволнового, ультразвукового и радиоизлучений), так и гипертермия всего организма [139] (нагревание до 41–47°C в течение 1 ч). При локальном разогреве до 70°C продолжительность процедуры может быть снижена до 3–4 мин. Локальная и общая гипертермия вызывают необратимое повреждение клеток, обусловленное нарушением проницаемости клеточных мембран и денатурацией белков. При этом, естественно, повреждаются и здоровые ткани, что накладывает существенные ограничения на применение этого метода.

Революция в термотерапии рака связана с использованием лазерного излучения, что позволило обеспечить управляемое и направленное повреждение опухолевых тканей [140]. Соединение лазерного излучения и оптоволоконных световодов дало отличные результаты и получило название внутритканевой лазерной гипертермии [141]. К недостаткам лазерной терапии относятся низкая селективность, связанная с необходимостью использовать мощные лазеры для эффективной стимуляции гибели опухолевых клеток.

В 2003 г. ЗНЧ впервые применили в качестве агентов для фототермической терапии [142, 143], которую позднее было предложено называть плазмонной фототермической терапией (ПФТТ) [139]. В работе [144] описан новый метод селективного повреждения

клеток-мишеней, основанный на использовании 20 и 30 нм золотых наносфер, облучаемых 20 нс лазерными импульсами (532 нм), для создания локального нагрева. Для импульсной фототермии в модельном эксперименте использовали сэндвич-технология мечения Т-лимфоцитов конъюгатами ЗНЧ. Особо перспективным представляется использование ЗНЧ для фототермической терапии устойчивых к химиотерапии форм рака. В отличие от фотосенсибилизаторов (см. ниже), уникальность ЗНЧ определяется длительным сохранением оптических свойств в клетках при определенных условиях. Последовательное облучение несколькими лазерными импульсами позволяет контролировать инактивацию клеток нетравматическим способом, а использование одновременно рассеивающих и поглощающих свойств наночастиц – ПФТТ с помощью оптической томографии [33].

На рис. 8 приведен пример успешной терапии привитой опухоли у мышей [145]. Дальнейшее развитие метода ПФТТ и его продвижение в клиническую практику зависит от успешного решения многих задач, главные среди которых: 1) выбор оптимальных по оптическим свойствам наночастиц; 2) повышение контраста накопления наночастиц в опухоли и снижение общей потенциальной токсичности; 3) разработка способов доставки оптического излучения к мишеням и поиск альтернативных источников излучения, сочетающих высокую проникающую способность с возможностью нагрева ЗНЧ.

Первое требование определяется согласованием спектрального положения максимума плазмонного резонанса поглощения с окном прозрачности биотканей в ближней ИК-области 700–900 нм. Опубликован [113] обобщающий теоретический анализ фототермической эффективности ЗНЧ в зависимости от их размера, формы, структуры и степени агрегации. Показано, что хотя сами золотые наносферы неэффективны в ближнем ИК-диапазоне, агрегаты таких частиц могут быть очень эффективными при достаточно малых межчастичных расстояниях (менее 0.1 диаметра). Подобные кластеры формируются как на поверхности клеток, так и внутри них [146]. Получены данные об усилении ПФТТ за счет кластеризации [147, 148]. В частности, установлено [147], что малые агрегаты из 30 нм частиц позволяют разрушать раковые клетки при мощности в 20 раз меньшей, чем в контроле без частиц.

Определены также оптимальные для ПФТТ параметры золотых нанооболочек и наностержней [113, 149]. К настоящему моменту опубликовано много работ, в которых описано применение золотых наностержней [32, 150], нанооболочек [142, 151] и сравнительно нового класса частиц – золото-серебряных наноклеток для ПФТТ [152, 153]. Результаты сравне-

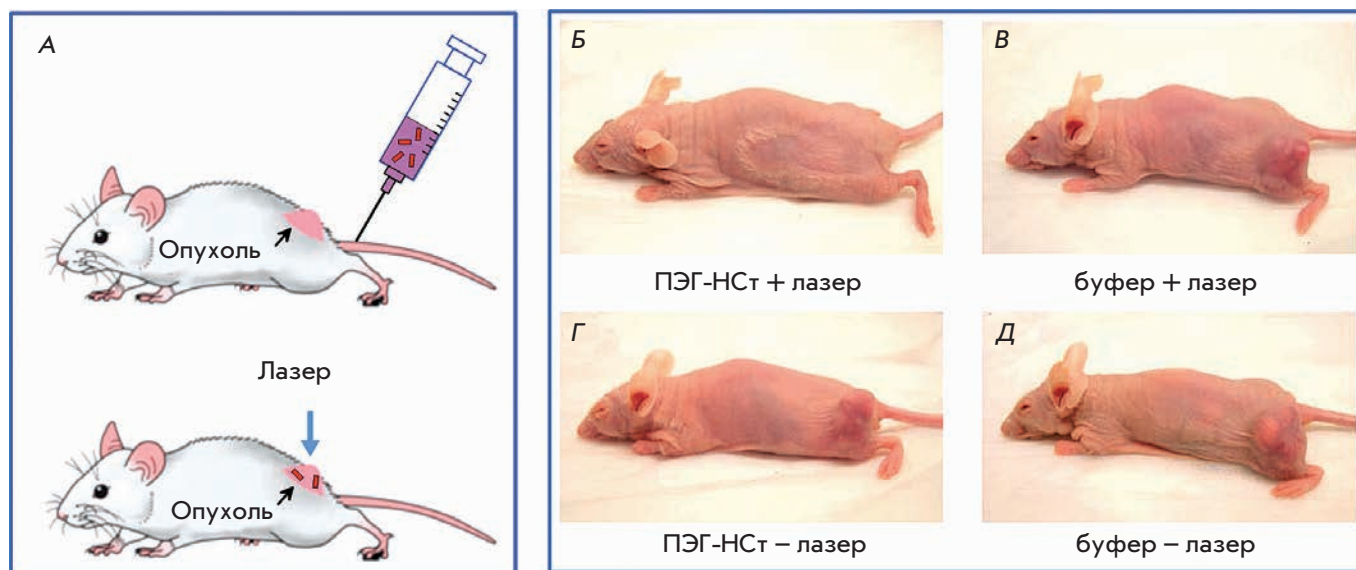


Рис. 8. Схема эксперимента, показывающего накопление золотых наностержней (НСт) после введения в хвостовую вену мыши (А). Результаты опыта по фототермической деструкции привитой опухоли у мыши (2–3 нед. после инъекции мышам опухолевых клеток MDA-MB-435 человека). Облучение лазером (810 нм, 2 Вт/см², 5 мин) проведено через 72 ч после инъекции золотых наностержней, функционализированных полиэтиленгликолем (ПЭГ-НСт, 20 мг Au/кг) (Б) или буфера (В). Видно, что при облучении без частиц (контроль В), равно как и при введении частиц или буфера без облучения (контроли Г и Д), опухоль продолжала развиваться, и только в опыте (Б) получена полная деструкция. Адаптировано по данным [145] с разрешения Informa Healthcare Communications.

ния эффективности нагрева наностержней, наноболочек и наноклеток приведены в работах [25, 154].

В связи с оптимизацией параметров частиц следует иметь в виду три принципиальных момента. Во-первых, собственное поглощение не является единственным параметром, определяющим эффективность ПФТТ [155]. Быстрый нагрев наночастиц или кластеров приводит к формированию паровых пузырьков [156], которые могут вызывать кавитационное повреждение клеток при облучении видимым [148] или ближним ИК-светом [157]. Эффективность образования паровых пузырьков существенно увеличивается при образовании кластеров наночастиц [143, 146]. Возможно именно этот эффект, а не усиленное поглощение определяет более сильное повреждение клеток при прочих равных условиях [155]. Наконец, облучение наночастиц мощными резонансными наносекундными ИК-импульсами может приводить к деструкции частиц уже после первого импульса (см., например, [158, 159] и ссылки в них). В серии работ Лапотко и соавт. (см. [160] и ссылки в этой статье) обратили внимание на то, что разогрев ЗНЧ и их деструкция могут приводить к резкому снижению фототермической эффективности «холодных» частиц, настроенных на длину волны лазера. Использование фемтосекундных импульсов не решает проблему из-

за низкой доставляемой энергии, поэтому необходим тщательный контроль сохранения свойств наночастиц для выбранного режима облучения.

Рассмотрим теперь второй вопрос, связанный с проблемой целевой доставки наночастиц в опухоль. Этот вопрос имеет два важных аспекта: повышение контраста в целевой биомассе и снижение побочных эффектов, обусловленных накоплением ЗНЧ в других органах, прежде всего в печени и селезенке (см. ниже). Обычно используются две стратегии доставки. Первая основана на конъюгации ЗНЧ с ПЭГ, вторая – на конъюгации с антителами к определенным маркерным белкам опухолевых клеток. ПЭГ используется для увеличения биодоступности и стабильности наночастиц, приводящих к увеличению времени их циркуляции в кровотоке. Покрытые цитратом золотые наносферы, ЦТАБ-покрытые наностержни, а также наноболочки имеют низкую устойчивость в солевых буферных растворах. При конъюгации наночастиц с ПЭГ их стабильность существенно улучшается, предотвращая солевую агрегацию.

In vivo пэгилированные наночастицы предпочтительно накапливаются в опухолевой ткани благодаря увеличенной проницаемости сосудов опухоли [161] и удерживаются в ней за счет уменьшенного лим-

фооттока. Кроме того, пэгилированные наночастицы менее доступны для иммунной системы (stealth technologies). Этот метод доставки называют пассивным, в отличие от активного – с использованием антител [162] (рис. 9). Активный метод доставки более надежен и эффективен. В нем используются антитела к определенным опухолевым маркерам. Наиболее часто такими маркерами служит рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) и его разновидности (например, Her2) [151, 163], фактор некроза опухоли (ФНО) [164]. Особенно перспективным представляется использование конъюгатов ЗНЧ с антителами одновременно как для диагностики, так и для фототермической терапии (методы так называемой тераностики) [165]. В дополнение к антителам для активной доставки может использоваться фолиевая кислота, лиганд многочисленных фолатных рецепторов опухолевых клеток [150], а также гормоны [166].

В самое последнее время вопрос об эффективности адресной доставки наночастиц в опухоль вновь стал предметом изучения и дискуссии [167]. В опытах с липосомами, мечеными анти-Her2-антителами [168], и ЗНЧ, мечеными трансферрином [169], показано, что функционализация улучшает проникновение наночастиц в клетки, но не увеличивает существенно контраст накопления частиц в опухоли. Изучены [167] биораспределение и локализация золотых наностержней, меченных тремя типами зондовых молекул, включая (1) scFv-фрагмент антител EGFR; (2) N-концевой фрагмент пептида, узнающего рецептор урокиназного активатора плазминогена (uPAR); (3) циклический RGD-пептид, распознающий $\alpha_v\beta_3$ -рецептор интегрин. Оказалось, что все три типа лигандов незначительно улучшают контраст накопления наночастиц в клеточных моделях и в опухоли при внутривенном введении, но сильно влияют на внеклеточное распределение и внутриклеточную локализацию. Поэтому сделан вывод, что в случае ПФТТ введение частиц непосредственно в опухоль может быть более эффективным, чем внутривенное.

Последний важный вопрос современной ПФТТ связан с эффективной доставкой излучения к биомишени. Поскольку поглощение хромофоров биотканей в видимой области на два порядка меньше, чем в ближнем ИК-свете [138], то использование ИК-излучения радикально снижает нецелевую тепловую нагрузку и увеличивает проникновение излучения в глубь тканей. Тем не менее, глубина проникновения обычно не превышает 5–10 мм [142, 170], поэтому необходим поиск альтернативных решений. Первый подход состоит в использовании импульсных (наносекунды) режимов облучения вместо непрерывных, что позволяет поднять мощность излучения без увеличения побочных эффектов. Второй подход состоит

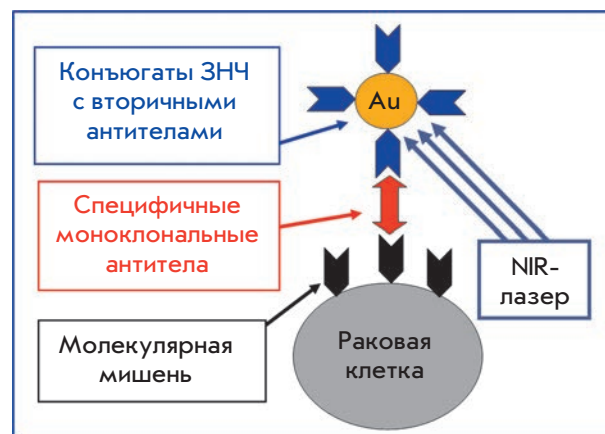


Рис. 9. Схема плазмонной фототермической терапии с активным методом доставки ЗНЧ к опухолевым клеткам. Воспроизведено из работы [8] с разрешения Elsevier.

в использовании оптоволоконных устройств для эндоскопической или внутритканевой доставки излучения. Плюсы и минусы такого подхода очевидны. Наконец, для гипертермии можно использовать излучение с большей глубиной проникновения, например радиоизлучение [171].

Конъюгаты ЗНЧ с антибиотиками и антителами использовали также в качестве фототермических агентов для селективного повреждения простейших и бактерий [172, 173]. Информацию по некоторым вопросам использования ПФТТ можно найти в книгах и обзорах [139, 170, 174, 175]. Особо следует отметить обстоятельный обзор [138].

2.2. Фотодинамическая терапия с использованием золотых наночастиц

Фотодинамический метод [176], применяемый при онкологических заболеваниях, некоторых кожных или инфекционных заболеваниях основан на использовании светочувствительных веществ – фотосенсибилизаторов (в том числе красителей), и, как правило, видимого света определенной длины волны. Сенсибилизатор вводится в организм чаще всего внутривенно, но может применяться аппликационно или перорально. Вещества для фотодинамической терапии (ФДТ) обладают способностью избирательно накапливаться в опухоли или иных целевых тканях (клетках). Пораженные ткани облучают лазерным светом с длиной волны, соответствующей максимуму поглощения красителя. Кроме обычного выделения тепла за счет поглощения [6], существенным является второй механизм, связанный с фотохимической генерацией синглетного кислорода и образованием высокоактивных

радикалов, которые вызывают некроз и апоптоз опухолевых клеток. ФДТ также приводит к нарушению питания и гибели опухоли за счет повреждения ее микрососудов. Главный недостаток ФДТ состоит в том, что фотосенсибилизатор остается в организме в течение длительного времени, оставляя ткани больного высокочувствительными к свету. С другой стороны, использование красителей для селективного нагрева тканей [6] имеет низкую эффективность из-за малого сечения поглощения хромофоров.

Хорошо известно [177], что металлические наночастицы – эффективные тушители флуоресценции. Однако недавно было показано [178], что интенсивность флуоресценции можно усилить плазмонной частицей, если молекулы разместить на оптимальном расстоянии от металла. В принципе, эта идея может использоваться для повышения эффективности ФДТ.

В ряде работ предложен метод доставки лекарственных средств в составе полиэлектролитных капсул на ЗНЧ, разрушающихся под воздействием лазерного излучения и доставляющих лекарство к мишеням [179, 180], или с помощью наночастиц, окруженных слоем полимерного наногеля [181, 182]. Кроме того, в составе наноконъюгатов используют фотоактивные вещества [183] и пептиды, облегчающие внутриклеточное проникновение [184]. Недавно предложено [185] использовать композитные наночастицы, в состав которых, помимо золотых наночастиц, входят магнитные частицы, фотодинамический краситель, ПЭГ и антитела. Наконец, по данным [186], конъюгаты наночастиц с фотодинамическими красителями способны оказывать синергичный антимикробный эффект.

Таким образом, золотые наноструктуры с плазмонным резонансом весьма перспективны для селективной ПФТТ онкологических и других заболеваний. Не вызывает сомнений, что ряд вопросов нуждается в дальнейшем изучении, например, стабильность, биосовместимость, химическое взаимодействие биоконъюгатов наночастиц в физиологических окружающих средах, время циркуляции в крови, проникновение в опухоль, взаимодействие с иммунной системой, вывод наночастиц и т.д. Мы ожидаем, что успех начальных этапов использования наночастиц для селективной ПФТТ может быть расширен в клинической стадии [138] при условии дальнейшего изучения оптимальных методических параметров.

2.3. Использование золотых наночастиц как терапевтического средства

Золотые наночастицы все активнее используют не только в диагностике и опытах по фототермолизу клеток, но и в терапевтических целях. В 1997 г. появилось первое сообщение об успешном примене-

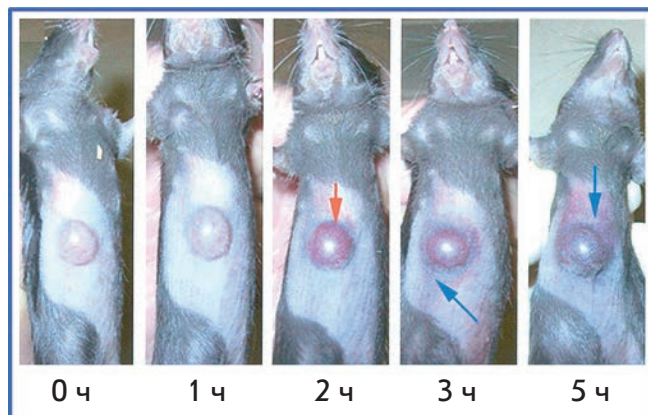


Рис. 10. Накопление конъюгата золотых наночастиц с ФНО в опухоли через 1–5 ч. Больным мышам внутривенно вводили 15 мкг вектора ЗНЧ-ФНО. Брюшная поверхность животного была сфотографирована в обозначенные времена, показывая изменения цвета опухоли за 5 ч. Красная стрелка показывает накопление вектора в опухоли; синие стрелки – в тканях, окружающих опухоль. Адаптировано из работы [191] с разрешения The American Association for Cancer Research.

нии коллоидного золота при ревматоидном артрите у человека [187]. В 2008 г. опубликован обширный материал по десятилетним клиническим испытаниям препарата Aurasol® для перорального применения при тяжелых формах ревматоидного артрита [188]. Описаны положительные результаты, достигнутые при внутрисуставном введении коллоидного золота крысам с коллаген-индуцированным артритом [189]. Авторы объясняют положительный эффект усилением антиангиогенной активности за счет связывания ЗНЧ с фактором роста сосудистого эндотелия и, вследствие этого, уменьшением инфильтрации макрофагов и воспаления. Сходные результаты получены и при подкожном введении золотых наночастиц крысам с коллаген- и пристан-индуцированным артритом [190].

Ученые из Мэрилендского университета использовали коллоидно-золотой вектор для доставки ФНО к солидным опухолям у мышей [191, 192]. При внутривенной инъекции конъюгат ЗНЧ с ФНО быстро накапливается в опухолевых клетках и не обнаруживается в клетках печени, селезенки и других здоровых органов. Накопление ЗНЧ в опухоли доказывается изменением цвета опухоли, которая становится ярко-красно-фиолетовой (цвет, характерный для коллоидного золота и его агрегатов), что совпадает с максимумом опухолиспецифичной активности ФНО (рис. 10). Вектор «коллоидное золото-ФНО» обладал меньшей токсичностью и большей эффек-

тивностью в уменьшении размеров опухоли, чем нативный ФНО, так как максимальная противоопухолевая реакция достигалась при использовании более низких доз лекарства. Препарат для внутривенного введения на основе конъюгата ЗНЧ с ФНО под названием AurImmune™ уже прошел вторую стадию клинических испытаний.

Антиангиогенные свойства ЗНЧ [193] наблюдали *in vitro* и *in vivo*. Оказалось, что ЗНЧ взаимодействуют с гепаринсвязывающими гликопротеинами – факторами сосудистой проницаемости, факторами роста сосудистого эндотелия и фибробластов. Эти вещества являются медиаторами ангиогенеза, в том числе в опухолевых тканях, и ЗНЧ ингибируют их активность. Поскольку интенсивный ангиогенез (процесс образования новых кровеносных сосудов в органах или тканях) рассматривается как один из основных факторов опухолевого роста, наличие у ЗНЧ антиангиогенных свойств делает их потенциально перспективными для терапии опухолей. Эта же группа исследователей показала, что золотые наночастицы усиливают апоптоз устойчивых к запрограммированной смерти клеток хронического лимфолейкоза [194], а также подавляют пролиферацию клеток множественной миеломы [195].

3. ЗОЛОТЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ – НОСИТЕЛИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Одно из наиболее перспективных и активно развивающихся направлений использования ЗНЧ в медицине – адресная доставка лекарственных средств [196, 197]. Самыми популярными объектами для адресной доставки являются противоопухолевые средства и антибиотики.

Предложены варианты использования конъюгатов ЗНЧ с такими противоопухолевыми средствами, как паклитаксель [192], метотрексат [198], даунорубин [199], гемцитабин [200], меркаптопурин [201], додецилцистеин [202], сульфонамид [203], фторурацил [204], комплексы платины [205], кахалалид [206], тамоксифен [207], герцептин [208], доксорубин [209], проспидин [210] и др. Конъюгацию осуществляли как путем простой физической адсорбции препаратов на ЗНЧ, так и с помощью алкантиольных линкеров. Действие конъюгатов оценивали как (в основном) на моделях *in vitro* – с использованием культур опухолевых клеток, так и *in vivo* – на мышцах с привитыми опухолями различной природы и локализации (карцинома легких Льюиса, аденокарцинома поджелудочной железы и др.). Кроме действующего вещества для создания системы доставки использовали таргетные молекулы (например, цетуксимаб), обеспечивающие лучшее закрепление и проникновение комплекса в клетки-мишени. Также предложено

применять мультимодальные системы доставки, когда золотая наночастица нагружена несколькими лекарственными средствами (как гидрофильными, так и гидрофобными), а также вспомогательными веществами – таргетными молекулами, красителями для фотодинамической терапии и т.п. [211]. Большинство исследователей отмечают высокую эффективность противоопухолевых средств, конъюгированных с золотыми наночастицами.

В качестве объектов, доставляемых золотыми наночастицами, рассматриваются также антибиотики и другие антибактериальные средства. Показана возможность получения стабильного комплекса ванкомицина с коллоидным золотом и эффективность такого комплекса в отношении различных, в том числе ванкомицин-устойчивых, энтеропатогенных штаммов *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* [212]. Сходные результаты получены и в работе [213]: комплекс ципрофлоксацина с золотыми наночастицами проявлял высокую антибактериальную активность по отношению к *E. coli*. Заметной антибактериальной и антигрибковой активностью против *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Aspergillus fumigatus* и *A. niger* обладает конъюгат антилейкозного препарата фторурацила с коллоидным золотом [214]. Необходимо отметить, что во всех перечисленных случаях комплексы лекарственных средств с золотыми наночастицами были устойчивыми, о чем можно было судить по оптическим спектрам конъюгатов.

В отличие от этого не удалось получить стабильные комплексы с золотыми наночастицами таких антибиотиков, как ампициллин, стрептомицин, канамицин, гентамицин, неомицин, стрептомицин, ципрофлоксацин, гатифлоксацин, норфлоксацин, активных в отношении *E. coli*, *M. luteus*, *S. aureus* и *P. aeruginosa* [215–217]. Тем не менее, в зависимости от антибиотика активность его смеси с коллоидным золотом на 12–40% превышала активность одного антибиотика. На основании этих данных сделаны выводы об усилении антибактериальной активности антибиотиков за счет ЗНЧ. Однако вопрос о механизмах возможного усиления антибактериального действия лекарственных средств остался невыясненным. Экспериментально доказано [218], что свободный гентамицин и его смесь с золотыми наночастицами достоверно не различаются по антимикробной активности в тестах как на плотной, так и на жидкой питательной среде. Предполагается, что для усиления антибактериальной активности необходимы стабильные конъюгаты наночастиц, покрытых молекулами антибиотика. Так, антибиотик цефаклор предложено [219] использовать непосредственно при синтезе ЗНЧ. В результате получили устойчивый конъюгат,

который обладал высокой антибактериальной активностью по отношению к *E. coli* и *S. aureus*.

Сведения о других лекарственных веществах, конъюгированных с золотыми наночастицами, встречаются гораздо реже. Однако необходимо отметить высокую антиоксидантную активность комплекса токоферола с золотыми наночастицами [220] и предложенные варианты его потенциального использования. Опубликованы данные о том [221], что конъюгат ЗНЧ с препаратом ТАК-779 за счет высокой локальной концентрации проявлял более выраженную активность против вируса иммунодефицита человека, чем сам препарат. На крысиных моделях сахарного диабета разработана методика перорального и интраназального введения инсулина, конъюгированного с коллоидным золотом, и достоверно показано снижение уровня сахара в крови, сравнимое с эффектом подкожного введения инсулина [222]. Наконец, описано терапевтическое действие противоревматического препарата этанерцепта, конъюгированного с золотыми наностержнями [223].

И в заключение этого раздела необходимо упомянуть о генотерапии, которая представляется идеальной стратегией при генетических, а также приобретенных заболеваниях [224]. Под генной терапией подразумевают подход, основанный на введении с лечебной целью в клетки и организм генных конструкций [225]. Желаемый эффект достигается либо в результате экспрессии введенного гена, либо за счет частичного или полного подавления функции поврежденного или сверхэкспрессируемого гена. В последнее время предпринимаются также попытки коррекции структуры и функции неправильно функционирующего («больного») гена. Золотые наночастицы и в этом случае могут служить эффективным средством доставки генетического материала в цитоплазму и ядро клетки [226].

4. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ

С двадцатых годов прошлого века большой интерес исследователей вызывали иммунологические свойства коллоидных металлов и, в частности, золота. Это было связано, главным образом, с физико-химической (неспецифической) теорией иммунитета Ж. Бордэ, которая постулировала, что иммуногенность, равно как и антигенная специфичность, зависят преимущественно от физико-химических свойств веществ и, в первую очередь, от их коллоидного состояния. Л.А. Зильбером предпринимались успешные попытки получить агглютинирующие сыворотки к коллоидному золоту [227]. Вместе с тем в ряде работ показано, что введение полноценного антигена вместе с коллоидными металлами стимулирует выработку

антител. Более того, обнаружено, что некоторые гаптены, адсорбированные на коллоидных частицах, могут вызывать образование антител. В одном из лучших ранних обзоров [228] приведены многочисленные данные о влиянии коллоидного золота на неспецифические иммунные реакции. В частности, отмечалось, что через 2 ч после внутривенного введения кроликам 5 мл коллоидного золота значительно повышается количество лейкоцитов в 1 мл крови (с 9900 до 19800) на фоне незначительного снижения мононуклеарных форм (с 5200 до 4900) и значительного увеличения полинуклеарных (с 4700 до 14900). Причем при введении других коллоидных металлов подобных явлений не наблюдалось. К сожалению, с развитием иммунологии и отрицанием многих положений теории Бордэ, интерес к иммунологическим свойствам коллоидов снизился. Хотя данные об усилении иммунного ответа на антигены, адсорбированные на коллоидных частицах, использовали при создании различных адъювантов.

Известно, что биосинтез антител индуцируется веществами, обладающими достаточно развитой структурой (иммуногенностью). К их числу принадлежат белки, полисахариды, некоторые синтетические полимеры. Значительная же часть биологически активных соединений (таких, как витамины, гормоны, антибиотики, наркотики и т.д.) имеют относительно низкую молекулярную массу и, как правило, вызывают низкий иммунный ответ. Для преодоления этого ограничения в стандартных методах получения антител *in vivo* такие вещества (гаптены) присоединяются химически к высокомолекулярным носителям (чаще всего белкам), что делает возможным получение специфичных антисывороток. Однако такие антисыворотки обычно содержат сопутствующие антитела к антигенным структурам носителя [229].

В 1986 г. в пионерской работе японских исследователей [230] появились сведения об успешной попытке получения антител к глутаминовой кислоте с использованием частиц коллоидного золота в качестве носителя. После этого вышел ряд работ, в которых применяли и развивали этот метод для получения антител к следующим гаптенам и полноценным антигенам: аминокислотам, фактору активации тромбоцитов, хинолиновой кислоте, биотину, рекомбинантным пептидам, лизофосфатидной кислоте, эндостатину, пептидам капсида вирусов гепатитов В и С, гриппа, ящура, α -амидированным пептидам, актину, антибиотикам, азобензолу, А β -пептиду, кленбутиролу, поверхностным антигенам иерсиний, вирусу трансмиссивного гастроэнтерита, туберкулину (см. обзор [231] и ссылки в нем). Во всех перечисленных работах гаптен непосредственно конъюгировали с частицами коллоидного золота, смешивали с полным

адъювантом Фрейнда и иммунизировали животных. В результате получали антисыворотки с высоким титром, которые не требовали дальнейшей очистки от балластных антител.

В 1993 г. предложили [232] перед конъюгированием с коллоидным золотом присоединять к белку-носителю гаптен (гамма-аминомасляную кислоту). Это предложение нашло поддержку в работах по получению антител к ряду пептидов, аминокислотам, фенил-β-D-тиоглюкорониду, диминазону (см. [231] и ссылки в нем). Антитела, полученные таким способом, обладали высокой специфичностью к антигенам и имели более высокий титр («чрезвычайно высокий», согласно [232]) – от 1 : 250000 до 1 : 1000000, чем антитела, полученные рутинным способом. В настоящее время фирма «ImmunoSolution» предлагает антитела к ряду нейротрансмиттеров и аминокислот, полученные согласно [232].

В 1996 г. впервые показали [233] возможность использования частиц коллоидного золота в составе противовирусной вакцины в качестве носителей белкового антигена капсида вируса клещевого энцефалита. Несмотря на то что в состав вакцины не входили адъюванты, экспериментальная вакцина обладала более высокими протективными свойствами по сравнению с коммерческими аналогами.

Появилось также значительное количество работ, посвященных использованию ЗНЧ для создания ДНК-вакцин с генными конструкциями, кодирующими белки, к которым необходимо получить антитела. В случае эффективной экспрессии генов эти белки служат антигенами для развития иммунного ответа. Особой популярностью среди наночастиц-носителей ДНК пользуются частицы коллоидного золота [234].

Описана технология получения антител против различных антигенов с применением коллоидного золота в качестве носителя и адъюванта [233, 235]. При этом антигены адсорбируются непосредственно на поверхности наночастиц золота без использования связующих реагентов. Установлено, что иммунизация животных конъюгатами коллоидного золота с антигеном (как с использованием полного адъюванта Фрейнда, так и без него) приводит к получению специфических антител с высоким титром к широкому кругу антигенов без балластных антител. Наночастицы золота могут стимулировать синтез антител у кроликов, крыс и мышей с более низкой дозой используемого антигена по сравнению с его количеством, требуемым при применении ряда обычных адъювантов (табл. 2).

Показано, что золотые наночастицы, используемые как носители антигенов, стимулируют фагоцитирующую активность макрофагов и влияют на функционирование лимфоцитов, что, вероятно,

Таблица 2. Показатели титров антител в процессе иммунизации кроликов иерсиниозным антигеном (согласно [235])

Препарат	1-я иммунизация	2-я иммунизация	Реиммунизация
Коллоидное золото + антиген (1 мг)	1:32	1:256	1:10240
Полный адъювант Фрейнда + антиген (100 мг)	1:32	1:256	1:10240
Физиологический раствор + антиген (100 мг)	1:2	1:16	1:512

может обуславливать их иммуномодулирующий эффект. Кроме того, золотые наночастицы и их конъюгаты с низко- и высокомолекулярными антигенами стимулируют дыхательную активность клеток ретикулоэндотелиальной системы и активность митохондриальных ферментов макрофагов [236], что, возможно, является одной из причин адъювантных свойств коллоидного золота. То, что золотые наночастицы действуют и как носитель, и как адъювант (т.е. представляют гаптены Т-клеткам), следует признать наиболее интересной стороной проявления иммуногенных свойств коллоидного золота. В частности, золотые наночастицы, конъюгированные с антигенами, влияют на активацию Т-клеток: обнаружено увеличение пролиферации в 10 раз по сравнению с добавлением нативного антигена. Этот факт указывает на принципиальную возможность направленного воздействия на Т-клетки с последующей активацией ими макрофагов и уничтожением патогена.

Однако ни в одной из работ мы не нашли сведений о механизмах подобных свойств золотых частиц. На наш взгляд, безусловно справедливы рассуждения [232] о предпочтительном макрофагальном ответе на корпускулярные антигены, в отличие от растворимых. Подтверждают этот факт и исследователи, изучающие механизмы действия ДНК-вакцин, использующие для транспортировки генетического материала в клетку золотые частицы [234]. В этих работах показана роль клеток Купфера и Лангерганса в формировании иммунного ответа. Обсуждается влияние дендритных клеток на формирование иммунного ответа при введении антигена, конъюгированного с золотыми наночастицами [237]. Кроме того, отмечается, что при использовании наночастиц в медицинской практике необходимо следить за отсутствием на их поверхности липополисахаридов. Взаимодействию клеток иммунной системы с золотыми наночастицами посвящены недавние работы [238, 239].

На электронно-микроскопическом уровне показано [240] проникновение ЗНЧ, конъюгированных с пептидами, в цитоплазму макрофагов, что вызывает их активацию. Установлено, что после взаимодействия конъюгатов с рецепторами TLR-4 макрофагов, наночастицы проникают в клетку, что сопровождается выделением воспалительных цитокинов – ФНО, интерлейкинов 1 β и 6 и торможением пролиферации макрофагов. При введении ЗНЧ количество макрофагов уменьшается, а их размер увеличивается [241]. При этом возрастает уровень интерлейкинов 1 и 6 и ФНО. Не исключен и другой (не воспалительный) путь проникновения наночастиц золота в макрофаги [242] – посредством взаимодействия с рецепторами мусорщиками. Изучено влияние неконъюгированного коллоидного золота на иммунокомпетентные клетки *in vivo* [243] и показано, что введение мышам ЗНЧ вызывает усиление пролиферации лимфоцитов и нормальных киллеров, увеличение выработки интерлейкина 2.

По нашему мнению, обнаружение адъювантных свойств у ЗНЧ создает благоприятные условия для разработки нового поколения вакцин.

5. БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЕ И ТОКСИЧНОСТЬ ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ

Сказанное выше показывает, что в последние годы ЗНЧ активно используется в различных областях наномедицины в диагностических и терапевтических целях. Причем все чаще их вводят в организм животных и человека парентерально. Практически синхронно с началом применения ЗНЧ в медицине возникли острые вопросы по поводу их биораспределения, циркуляции в кровяном русле, фармакокинетики и выведения из организма, а также о возможной токсичности на уровне целого организма или на уровне цито- и генотоксичности. Следует отметить, что данные о биораспределении и токсичности ЗНЧ пока скудны и противоречивы.

Анализ опубликованных данных показал, что взрыв активности исследований в области биораспределения и токсичности ЗНЧ приходится на последние 3–4 года [7, 244–248]. Поскольку многие группы начали свои проекты независимо, наблюдается большой разброс в дизайне эксперимента, включая размер и форму частиц, способы функционализации, типы животных, дозы и способ введения частиц и т.д. Соответственно наблюдается большой разброс данных и выводов об уровне и кинетике биораспределения и по оценкам токсичности. Однако уже сейчас можно сделать некоторые предварительные выводы.

Во-первых, органы ретикулоэндотелиальной системы служат основной мишенью для накопления

ЗНЧ размером 10–100 нм, причем с уменьшением размера равномерность биораспределения увеличивается. Быстрое снижение концентрации частиц в крови и их длительное удерживание в организме связано с функционированием гепатобилиарной системы. Поскольку накопленные частицы могут выводиться из печени и селезенки в течение 3–4 месяцев, вопрос о дозах и возможных воспалительных процессах исключительно важен.

Во-вторых, имеющиеся данные позволяют предположить, что эффект проникновения наночастиц через гематоэнцефалический барьер критически зависит от размера, с верхней границей для частиц размером 15–20 нм. В-третьих, золотые наночастицы диаметром 1–2 нм имеют потенциально более высокую токсичность за счет возможности необратимого связывания с биополимерами клеток. Вместе с тем многочисленные опыты на клеточных культурах не выявили заметной токсичности у коллоидных частиц размером 3–100 нм при условии, что предельная доза не превышает величины порядка 10^{12} частиц/мл.

Данные экспериментов *in vivo* немногочисленны и несколько противоречивы. Можно лишь предположить, что заметная токсичность отсутствует при кратковременном (около недели) введении ЗНЧ в суточной дозе, не превышающей 0.5 мг/кг.

Данные последнего времени указывают на резко возросший интерес и интенсивность исследований в области нанотоксикологии. На *рис. 11* приведена общая схема изучения биораспределения и токсичности наночастиц, которая может быть использована при планировании экспериментов [248]. Для более полного ознакомления с проблемами биораспределения и токсичности ЗНЧ мы рекомендуем обзоры [244–248].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Благодаря бурному развитию технологий химического синтеза ЗНЧ за последнее десятилетие сегодня в распоряжении исследователей имеется огромное разнообразие частиц по размеру, форме, структуре и оптическим свойствам. Более того, на повестку дня поставлен вопрос о моделировании наночастиц, обладающих необходимыми физическими (оптическими, тепловыми и т.д.) свойствами с последующей разработкой методик синтеза смоделированных наноструктур.

С точки зрения применения в медицине, важное значение имела разработка эффективных технологий функционализации ЗНЧ различными классами молекул, которые обеспечивают стабилизацию наночастиц в условиях *in vivo* и адресное взаимодействие с биологическими мишенями. На сегодняшний день лучшими стабилизаторами считаются тиолирован-



Рис. 11. Схема экспериментов по биораспределению. Первый этап включает синтез наночастиц и их характеристику (определение размера, формы, заряда и т.д.) методами электронной микроскопии (ПЭМ, РЭМ), динамического светорассеяния (ДСР) и UV-vis-спектроскопии поглощения и рассеяния на уровне суспензий или отдельных частиц, электрофореза (ЭФ) и другими методами. На втором этапе проводится функционализация поверхности частиц требуемыми лигандами, например тиолированными молекулами ПЭГ (ПЭГ-SH), полиэтиленоксида (ПЭО-SH), белками сыворотки крови (БСК), фактором некроза опухоли (ФНО- α) и т.п. Полученные конъюгаты вводятся в модель (мышь, крыса и т.д.) в соответствии с дизайном опыта (дозы, кратность, способ введения – внутривенный (ВВ), внутрибрюшинный (ИП), респираторный (РЕ), желудочно-кишечный (ГЭ)). Распределение по органам и кинетика накопления / выведения наночастиц осуществляется по выбранной схеме отбора проб, которые анализируются методами радиоактивного анализа (РА), инструментальной нейтронной активации (ИНА), масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (МС-ИСП) или атомно-адсорбционной спектроскопии (ААС). Проводится также идентификация частиц на тканевом (гистология, ГИСТ) и клеточном уровне и локализация ЗНЧ с использованием методов ПЭМ, энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭДРС) и рентгеновской адсорбционной спектроскопии (РАС). На последнем этапе проводится биологическая характеристика, включая оценку проникновения в клетки, цито- и генотоксичности, апоптоза (с использованием стандартных тестов MTT и WST-1) и т.д., с финальной оценкой возможных рисков. Воспроизведено из работы [248] (<http://dx.doi.org/10.1039/c0cs00018c>) с разрешения The Royal Society of Chemistry.

ные производные ПЭГ и иных молекул. В частности, ПЭГ-покрытые частицы способны дольше циркулировать в кровотоке и менее подвержены атаке клеточных компонентов иммунной системы.

Сегодня уже общепризнано, что конъюгаты ЗНЧ являются отличными метками для задач биоимиджинга, который может быть реализован при помощи различных оптических технологий, включая темнопольную микроскопию резонансного рассеяния, конфокальную лазерную микроскопию, различные варианты двухфотонной люминесценции ЗНЧ, оптическую когерентную и акустическую томографию и т.д.

Конъюгаты ЗНЧ нашли применение в аналитических исследованиях, которые могут быть основаны как на современных инструментальных методах (поверхностно-усиленная рамановская спектроскопия, LISNA, ИК-Фурье и т.д.), так и на простых твердофазных или гомофазных методиках (дот-анализ, иммунохроматография). В качестве показательных можно привести два примера: (1) с помощью конъюгатов ЗНЧ с антителами можно определить про-

статспецифический антиген с чувствительностью, в миллион раз большей, чем в обычном иммуноферментном анализе [249]; (2) резкая зависимость цвета от межчастичных расстояний позволяет *визуально* детектировать мутантные ДНК в так называемом «Northwestern spot test» [68]. Наряду с описанными примерами клинической диагностики рака, болезни Альцгеймера, HIV, гепатита туберкулеза, сахарного диабета и других заболеваний, следует ожидать новых диагностических применений ЗНЧ.

Плазменная фототермическая лазерная терапия рака с помощью ЗНЧ, впервые описанная в 2003 г., в настоящее время перешла в стадию клинической апробации. Реальные клинические успехи этой технологии будут зависеть от того, как быстро удастся решить несколько актуальных проблем: (1) разработать эффективные методы доставки излучения к опухолям внутри организма с помощью оптоволоконных технологий или неоптических методов нагре-

ва; (2) усовершенствовать методы доставки конъюгатов к опухолям, повысить контраст и равномерность накопления; (3) разработать методы контроля процесса фототермолиза *in situ*.

Адресная доставка ДНК, антигенов и лекарственных средств с помощью ЗНЧ представляется одним из наиболее перспективных направлений в биомедицине. В частности, работы группы Уоррена Чаня из Торонтского университета [250] показали зависимость от размера возможность доставки конъюгатов ЗНЧ с герцептином в опухолевые клетки с гораздо большей эффективностью, чем препарата в чистом виде. Недавний критический пересмотр концепции ПФТТ, основанной на внутривенной адресной доставке ЗНЧ, конъюгированных с молекулярными зондами к опухолевым рецепторам [167], указывает на необходимость продолжения исследований в этом направлении. В свете данных [167] представляется вполне рациональным, например, использование «ненацеленных» ПЭГ-покрытых золотых наноболочек типа SiO₂/Au с диаметром ядра 120 нм и толщиной слоя золота 15–20 нм в качестве универсального маркера для ПФТТ и биоимиджинга [25, 41]. Подчеркнем, что группа Н. Халас и Дж. Вест из университета Райса в США в 2010 г. начала клинические испытания подобных частиц для ПФТТ.

Наконец, имеется необходимость в продолжении и расширении работ в области биораспределения и токсичности ЗНЧ. Прежде всего, необходима скоординированная программа, которая выявила бы корреляции между параметрами частиц (размер, форма, функционализация различными молекулярными зондами), параметрами эксперимента (модель, дозы, способ и временная схема введения, длительность наблюдений, исследуемые органы, клетки, субклеточные структуры и т.п.) и наблюдаемыми биологическими эффектами. Необходимы также скоординированные усилия по введению стандартов на частицы и методы, используемые для тестирования токсичности наноматериалов. ●

Работа была частично поддержана грантами Программы Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» (направление «Биофотоника»), РФФИ, Министерства образования и науки РФ (контракты 2.1.1/2950, 14.740.11.260 и 02.740.11.0484), а также грантом Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Antonii F. Panacea Aurea-Auro Potabile. Hamburg: Ex Bibliopolio Frobeniano, 1618. 250 p.
2. Faulk W.P., Taylor G.M. // *Immunochemistry*. 1971. V. 8. P. 1081–1083.
3. Дыкман Л.А., Богатырев В.А., Щеголев С.Ю., Хлебцов Н.Г. Золотые наночастицы: синтез, свойства, биомедицинское применение. М.: Наука, 2008. 319 с.
4. Gold Nanoparticles: Properties, Characterization and Fabrication / Ed. P.E. Chow. N. Y.: Nova Science Publisher, 2010. 343 p.
5. Дыкман Л.А., Богатырев В.А. // *Успехи химии*. 2007. Т. 76. С. 199–213.
6. Wilson R. // *Chem. Soc. Rev.* 2008. V. 37. P. 2028–2045.
7. Boisselier E., Astruc D. // *Chem. Soc. Rev.* 2009. V. 38. P. 1759–1782.
8. Khlebtsov N.G., Dykman L.A. // *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer*. 2010. V. 111. P. 1–35.
9. Хлебцов Н.Г. // *Квант. электроника*. 2008. Т. 38. С. 504–529.
10. Colloidal Gold: Principles, Methods, and Applications / Ed. M.A. Hayat. San Diego: Acad. Press, 1989. V. 1. 538 p.; V. 2. 484 p.; 1990. V. 3. 421 p.
11. Бунин В.Д., Игнатов О.В., Гулий О.И., Волошин А.Г., Дыкман Л.А., О'Нейл Д., Ивницкий Д. // *Биофизика*. 2005. Т. 50. С. 316–321.
12. Дрыгин Ю.Ф., Блинцов А.Н., Осипов А.П., Григоренко В.Г., Андреева И.П., Усков А.И., Варицев Ю.А., Анисимов Б.В., Новиков В.К., Атабеков И.Г. // *Биохимия*. 2009. Т. 74. С. 1212–1220.
13. Naja G., Hrapovic S., Male K., Bouvrette P., Luong J.H.T. // *Microsc. Res. Tech.* 2008. V. 71. P. 742–748.
14. Phillips R.L., Miranda O.R., You C.C., Rotello V.M., Bunz U.H. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2008. V. 47. P. 2590–2594.
15. Пылаев Т.Е., Ханадеев В.А., Хлебцов Б.Н., Дыкман Л.А., Богатырев В.А., Хлебцов Н.Г. // *Коллоидный журн.* 2011. Т. 73. № 2. С. 1–12.
16. Liu M., Guyot-Sionnest P. // *J. Phys. Chem. B*. 2005. V. 109. P. 22192–22200.
17. Khlebtsov B., Khanadeev V., Khlebtsov N. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2010. V. 12. P. 3210–3218.
18. Wang H., Brandl D.W., Le F., Nordlander P., Halas N.J. // *Nano Lett.* 2006. V. 6. P. 827–832.
19. Khlebtsov B.N., Khanadeev V.A., Ye J., Mackowski D.W., Borghs G., Khlebtsov N.G. // *Phys. Rev. B*. 2008. V. 77. P. 035440–1–035440–14.
20. Schwartzberg A.M., Olson T.Y., Talley C.E., Zhang J.Z. // *J. Phys. Chem. B*. 2006. V. 110. P. 19935–19944.
21. Ye J., van Dorpe P., van Roy W., Borghs G., Maes G. // *Langmuir*. 2009. V. 25. P. 1822–1827.
22. Sanchez-Gaytan B.L., Park S.-J. // *Langmuir*. 2010. V. 26. P. 19170–19174.
23. Nehl C.L., Liao H., Hafner J.H. // *Nano Lett.* 2006. V. 6. P. 683–688.
24. Grzelczak M., Pérez-Juste J., Mulvaney P., Liz-Marzán L.-M. // *Chem Soc. Rev.* 2008. V. 37. P. 1783–1791.
25. Хлебцов Б.Н., Ханадеев В.А., Максимова И.Л., Терентюк Г.С., Хлебцов Н.Г. // *Российские нанотехнологии*. 2010. Т. 5. С. 454–468.
26. Ramakrishna G., Dai Q., Zou J., Huo Q., Goodson Th. //

- J. Am. Chem. Soc. 2007. V. 129. P. 1848–1849.
27. Wang G., Stender A.S., Sun W., Fang N. // *Analyst*. 2010. V. 135. P. 215–221.
28. Klein S., Petersen S., Taylor U., Rath D., Barcikowski S. // *J. Biomed. Opt.* 2010. V. 15. P. 036015.
29. Durr N.J., Larson T., Smith D.K., Korgel B.A., Sokolov K., Ben-Yakar A. // *Nano Lett.* 2007. V. 7. P. 941–945.
30. Maiorano G., Sabella S., Sorce B., Brunetti V., Malvindi M.A., Cingolani R., Pomba P.P. // *ACS Nano*. 2010. V. 4. P. 7481–7491.
31. El-Sayed I.H., Huang X.H., El-Sayed M.A. // *Nano Lett.* 2005. V. 5. P. 829–834.
32. Huang X., El-Sayed I.H., Qian W., El-Sayed M.A. // *J. Am. Chem. Soc.* 2006. V. 128. P. 2115–2120.
33. Loo C., Hirsch L., Lee M., Chang E., West J., Halas N., Drezek R. // *Opt. Lett.* 2005. V. 30. P. 1012–1014.
34. Aaron J., de la Rosa E., Travis K., Harrison N., Burt J., José-Yakamán M., Sokolov K. // *Opt. Express*. 2008. V. 16. P. 2153–2167.
35. Au L., Zhang Q., Cobley C.M., Gidding M., Schwartz A.G., Chen J., Xia Y. // *ACS Nano*. 2010. V. 4. P. 35–42.
36. Schultz D.A. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2003. V. 14. P. 13–22.
37. York J., Spetzler D., Hornung T., Ishmukhametov R., Martin J., Frasch W.D. // *J. Bioenerg. Biomembr.* 2007. V. 39. P. 435–439.
38. Hu R., Yong K.T., Roy I., Ding H., He S., Prasad P.N. // *J. Phys. Chem. C*. 2009. V. 113. P. 2676–2684.
39. Bickford L., Chang J., Fu K., Sun J., Hu Y., Gobin A., Yu T.K., Drezek R. // *Nanobiotechnology*. 2008. V. 4. P. 1–8.
40. Wang S.-H., Lee C.-W., Chiou A., Wei P.-K. // *J. Nanobiotechnology*. 2010. V. 8. <http://www.jnanobiotechnology.com/content/8/1/33>.
41. Khanadeev V.A., Khlebtsov B.N., Staroverov S.A., Vidyasheva I.V., Skaptsov A.A., Ilineva E.S., Bogatyrev V.A., Dykman L.A., Khlebtsov N.G. // *J. Biophotonics*. 2011. V. 4. P. 74–83.
42. Zagaynova E.V., Shirmanova M.V., Kirillin M.Yu., Khlebtsov B.N., Orlova A.G., Balalaeva I.V., Sirotkina M.A., Bugrova M.L., Agrba P.D., Kamensky V.A. // *Phys. Med. Biol.* 2008. V. 53. P. 4995–5009.
43. Kim D., Park S., Lee J.H., Jeong Y.Y., Jon S. // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. V. 129. P. 7661–7665.
44. Patra C.R., Jing Y., Xu Y.-H., Bhattacharya R., Mukhopadhyay D., Glockner J.F., Wang J.-P., Mukherjee P. // *Cancer Nano*. 2010. V. 1. P. 13–18.
45. Zharov V., Galanzha E., Shashkov E., Khlebtsov N., Tuchin V. // *Opt. Lett.* 2006. V. 31. P. 3623–3625.
46. Li C., Wang L.V. // *Phys. Med. Biol.* 2009. V. 54. P. R59–R97.
47. Chen J., Irudayaraj J. // *ACS Nano*. 2009. V. 3. P. 4071–4079.
48. Hutter E., Boridy S., Labrecque S., Lalancette-Hébert M., Kriz J., Winnik F.M., Maysinger D. // *ACS Nano*. 2010. V. 4. P. 2595–2606.
49. Деев С.М., Лебеденко Е.Н. // *Acta Naturae*. 2009. T. 1. № 1. С. 32–50.
50. Leuversing J.H.W., Thal P.J.H.M., van der Waart M., Schuurs A.H.W.M. // *J. Immunoassay*. 1980. V. 1. P. 77–91.
51. Khlebtsov N.G., Melnikov A.G., Dykman L.A., Bogatyrev V.A. // *Photopolarimetry in Remote Sensing* / Eds G. Videen, Ya.S. Yatskiv, M.I. Mishchenko. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 2004. P. 265–308.
52. Wu S.H., Wu Y.S., Chen C.H. // *Anal. Chem.* 2008. V. 80. P. 6560–6566.
53. Leuversing J.H.W., Coverde B.C., Thal P.J.H.M., Schuurs A.H.W.M. // *J. Immunol. Meth.* 1983. V. 60. P. 9–23.
54. Pavlov V., Xiao Y., Shlyahovsky B., Willner I. // *J. Am. Chem. Soc.* 2004. V. 126. P. 11768–11769.
55. Aslan K., Lakowicz J.R., Geddes C.D. // *Anal. Biochem.* 2004. V. 330. P. 145–155.
56. Medley C.D., Smith J.E., Tang Z., Wu Y., Bamrungsap S., Tan W. // *Anal. Chem.* 2008. V. 80. P. 1067–1072.
57. Chirathaworn C., Chantaramalai T., Sereemasun A., Kongthong N., Suwancharoen D. // *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2011. V. 34. P. 31–34.
58. Neely A., Perry C., Varisli B., Singh A.K., Arbneshti T., Senapati D., Kalluri J.R., Ray P.C. // *ACS Nano*. 2009. V. 3. P. 2834–2840.
59. Guarise C., Pasquato L., De Filippis V., Scrimin P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. P. 3978–3982.
60. Liu X., Dai Q., Austin L., Coutts J., Knowles G., Zou J., Chen H., Huo Q. // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. V. 130. P. 2780–2782.
61. Wang X., Li Y., Wang H., Fu Q., Peng J., Wang Y., Du J., Zhou Y., Zhan L. // *Biosens. Bioelectron.* 2010. V. 26. P. 404–410.
62. Хлебцов Н.Г., Богатырев В.А., Хлебцов Б.Н., Дыкман Л.А., Englebienne P. // *Коллоидный журн.* 2003. Т. 65. С. 679–693.
63. Englebienne P. // *Analyst*. 1998. V. 123. P. 1599–1603.
64. Kamnev A.A., Dykman L.A., Tarantilis P.A., Polissiou M.G. // *Biosci. Reports*. 2002. V. 22. P. 541–547.
65. Russier-Antoine I., Huang J., Benichou E., Bachelier G., Jonin C., Brevet P.F. // *Chem. Phys. Lett.* 2008. V. 450. P. 345–349.
66. Lin C.-C., Yang Y.-M., Chen Y.-F., Yang T.-S., Chang H.-C. // *Biosens. Bioelectron.* 2008. V. 24. P. 178–183.
67. Mirkin C.A., Letsinger R.L., Mucic R.C., Storhoff J.J. // *Nature*. 1996. V. 382. P. 607–609.
68. Elghanian R., Storhoff J.J., Mucic R.C., Letsinger R.L., Mirkin C.A. // *Science*. 1997. V. 277. P. 1078–1081.
69. Sato K., Onoguchi M., Sato Y., Hosokawa K., Maeda M. // *Anal. Biochem.* 2006. V. 350. P. 162–164.
70. Baptista P., Koziol-Montewka M., Paluch-Oles J., Doria G., Franco R. // *Clin. Chem.* 2006. V. 52. P. 1433–1434.
71. Dai Q., Liu X., Coutts J., Austin L., Huo Q. // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. V. 130. P. 8138–8139.
72. Li H.X., Rothberg L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. V. 101. P. 14036–14039.
73. He W., Huang C.Z., Li Y.F., Xie J.P., Yang R.G., Zhou P.F., Wang J. // *Anal. Chem.* 2008. V. 80. P. 8424–8430.
74. Storhoff J.J., Elghanian R., Mucic R.C., Mirkin C.A., Letsinger R.L. // *J. Am. Chem. Soc.* 1998. V. 120. P. 1959–1964.
75. Sato K., Hosokawa K., Maeda M. // *J. Am. Chem. Soc.* 2003. V. 125. P. 8102–8103.
76. Song J., Li Z., Cheng Y., Liu Ch. // *Chem. Commun. (Camb.)*. 2010. № 46. P. 5548–5550.
77. Shawky S.M., Bald D., Azzazy H.M.E. // *Clin. Biochem.* 2010. V. 43. P. 1163–1168.
78. Xia F., Zuo X., Yang R., Xiao Y., Kang D., Vallée-Bélisle A., Gong X., Yuen J.D., Hsu B.B., Heeger A.J., Plaxco K.W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. P. 10837–10841.
79. Ma Z., Tian L., Wang T., Wang C. // *Anal. Chim. Acta*. 2010. V. 673. P. 179–184.
80. Storhoff J.J., Marla S.S., Bao P., Hagenow S., Mehta H., Lucas A., Garimella V., Patno T., Buckingham W., Cork W., Müller U.R. // *Biosens. Bioelectron.* 2004. V. 19. P. 875–883.
81. Storhoff J.J., Lucas A.D., Garimella V., Bao Y.P., Müller U.R. // *Nat. Biotechnol.* 2004. V. 22. P. 883–887.
82. Parab H.J., Jung C., Lee J.H., Park H.G. // *Biosens. Bioelectron.* 2010. V. 26. P. 667–673.
83. Stoschek C.M. // *Anal. Biochem.* 1987. V. 160. P. 301–305.

84. Dykman L.A., Bogatyrev V.A., Khlebtsov B.N., Khlebtsov N.G. // *Anal. Biochem.* 2005. V. 341. P. 16–21.
85. Brada D., Roth J. // *Anal. Biochem.* 1984. V. 142. P. 79–83.
86. Moeremans M., Daneles G., van Dijck A., Langanger G., De Mey J. // *J. Immunol. Meth.* 1984. V. 74. P. 353–360.
87. Surek B., Latzko E. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1984. V. 121. P. 284–289.
88. Hsu Y.-H. // *Anal. Biochem.* 1984. V. 142. P. 221–225.
89. Danscher G. // *Histochemistry.* 1981. V. 71. P. 81–88.
90. Ma Z., Sui S.-F. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002. V. 41. P. 2176–2179.
91. Hou S.-Y., Chen H.-K., Cheng H.-C., Huang C.-Y. // *Anal. Chem.* 2007. V. 79. P. 980–985.
92. Blab G.A., Cognet L., Berciaud S., Alexandre I., Husar D., Remacle J., Lounis B. // *Biophys. J.* 2006. V. 90. P. L13–L15.
93. Bio-Rad Labs Bulletin 1310. Western blotting detection systems: how do you choose? 1987. P. 3.
94. Дыкман Л.А., Богатырев В.А. // *Биохимия.* 1997. Т. 62. С. 411–418.
95. Стародуб Н.Ф., Артюх В.П., Назаренко В.И., Коломиец Л.И. // *Украинский биохимический журнал.* 1987. Т. 59. С. 108–120.
96. Fenoll A., Jado I., Vicioso D., Casal J. // *J. Clin. Microbiol.* 1997. V. 35. P. 764–766.
97. Bogatyrev V.A., Dykman L.A., Matora L.Yu., Schwartsburd B.I. // *FEMS Microbiol. Lett.* 1992. V. 96. P. 115–118.
98. Dykman L.A., Bogatyrev V.A. // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2000. V. 27. P. 135–137.
99. Khlebtsov B.N., Dykman L.A., Bogatyrev V.A., Zharov V., Khlebtsov N.G. // *Nanoscale Res. Lett.* 2007. V. 2. P. 6–11.
100. Хлебцов Б.Н., Ханадеев В.А., Богатырев В.А., Дыкман Л.А., Хлебцов Н.Г. // *Российские нанотехнологии.* 2008. Т. 3. № 7–8. С. 50–63.
101. Han A., Dufva M., Belleville E., Christensen C.B.V. // *Lab. Chip.* 2003. V. 3. P. 329–332.
102. Биохимические методы анализа / Ред. Б.Б. Дзантиев. М.: Наука, 2010. 391 с.
103. Cho J.-H., Paek S.-H. // *Biotechnol. Bioengineer.* 2001. V. 75. P. 725–732.
104. Schalkhammer Th. // *Chem. Monthly.* 1998. V. 129. P. 1067–1092.
105. Biosensors and Biodetection / Eds A. Rasooly, K.E. Herold. N.-Y.: Humana Press, 2009. V. 1. 454 p.; V. 2. 470 p.
106. Li Y., Schluesener H.J., Xu S. // *Gold Bull.* 2010. V. 43. P. 29–41.
107. Musick M.D., Keating C.D., Lyon L.A., Botsko S.L., Peña D.J., Holliday W.D., McEvoy T.M., Richardson J.N., Natan M.J. // *Chem. Mater.* 2000. V. 12. P. 2869–2881.
108. Shipway A.N., Katz E., Willner I. // *ChemPhysChem.* 2000. V. 1. P. 18–52.
109. Nath N., Chilkoti A. // *J. Fluorescence.* 2004. V. 14. P. 377–389.
110. Haynes C.L., van Duyne R.P. // *J. Phys. Chem. B.* 2001. V. 105. P. 5599–5611.
111. Lyon L.A., Musick M.D., Natan M.J. // *Anal. Chem.* 1998. V. 70. P. 5177–5183.
112. Miller M.M., Lazarides A.A. // *J. Phys. Chem. B.* 2005. V. 109. P. 21556–21565.
113. Khlebtsov B.N., Melnikov A.G., Zharov V.P., Khlebtsov N.G. // *Nanotechnology.* 2006. V. 17. P. 1437–1445.
114. Templeton A.C., Pietron J.J., Murray R.W., Mulvaney P. // *J. Phys. Chem. B.* 2000. V. 104. P. 564–570.
115. Stewart M.E., Anderton C.R., Thompson L.B., Maria J., Gray S.K., Rogers J.A., Nuzzo R.G. // *Chem. Rev.* 2008. V. 108. P. 494–521.
116. Sepúlveda B., Angelomé P.C., Lechuga L.M., Liz-Marzán L.M. // *Nano Today.* 2009. V. 4. P. 244–251.
117. Daghestani H.N., Day B.W. // *Sensors.* 2010. V. 10. P. 9630–9646.
118. Abbas A., Linman M.J., Cheng Q. // *Biosens. Bioelectron.* 2011. V. 26. P. 1815–1824.
119. Peng H.-I., Miller B.L. // *Analyst.* 2011. V. 136. P. 436–447.
120. Jason-Moller L., Murphy M., Bruno J. // *Curr. Protoc. Protein Sci.* 2006. Ch. 19. Unit 19.13.
121. Brainina K., Kozitsina A., Beikin J. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2003. V. 376. P. 481–485.
122. Baek T.J., Park P.Y., Han K.N., Kwon H.T., Seong G.H. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2008. V. 390. P. 1373–1378.
123. Mahmoud K.A., Luong J.H. // *Anal. Chem.* 2008. V. 80. P. 7056–7062.
124. Haes A.J., Chang L., Klein W.L., van Duyne R.P. // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. V. 127. P. 2264–2271.
125. Simonian A.L., Good T.A., Wang S.-S., Wild J.R. // *Anal. Chim. Acta.* 2005. V. 534. P. 69–77.
126. Boghaert E.R., Khandke K.M., Sridharan L., Dougher M., DiJoseph J.F., Kunz A., Hamann P.R., Moran J., Chaudhary I., Damle N.K. // *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2008. V. 61. P. 1027–1035.
127. Maier I., Morgan M.R., Lindner W., Pittner F. // *Anal. Chem.* 2008. V. 80. P. 2694–2703.
128. Huang T., Nallathambay P.D., Xu X.H. // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. V. 130. P. 17095–17105.
129. Aslan K., Zhang J., Lakowicz J.R., Geddes C.D. // *J. Fluoresc.* 2004. V. 14. P. 391–400.
130. Wang L., Jia X., Zhou Y., Xie Q., Yao S. // *Microchim. Acta.* 2010. V. 168. P. 245–251.
131. de la Escosura-Muñiz A., Sánchez-Espinel C., Díaz-Freitas B., González-Fernández A., Maltez-da Costa M., Merkoçi A. // *Anal. Chem.* 2009. V. 81. P. 10268–10274.
132. Eum N.-S., Yeom S.-H., Kwon D.-H., Kim H.-R., Kang S.-W. // *Sens. Actuator B Chem.* 2010. V. 143. P. 784–788.
133. Zhang J., Atay T., Nurmikko A.V. // *Nano Lett.* 2009. V. 9. P. 519–524.
134. Adamczyk M., Moore J.A., Yu Z. // *Methods.* 2000. V. 20. P. 319–328.
135. Raschke G., Kowarik S., Franzl T., Sönnichsen C., Klar T.A., Feldmann J., Nichtl A., Kürzinger K. // *Nano Lett.* 2003. V. 3. P. 935–942.
136. McFarland A.D., van Duyne R.P. // *Nano Lett.* 2003. V. 3. P. 1057–1062.
137. Mayer K.M., Hao F., Lee S., Nordlander P., Hafner J.H. // *Nanotechnology.* 2010. V. 21. P. 255503.
138. Kennedy L.C., Bickford L.R., Lewinski N.A., Coughlin A.J., Hu Y., Day E.S., West J.L., Drezek R.A. // *Small.* 2011. V. 7. P. 169–183.
139. Huang X., Jain P.K., El-Sayed I.H., El-Sayed M.A. // *Lasers Med. Sci.* 2008. V. 23. P. 217–228.
140. Minton J.P., Carlton D.M., Dearman J.R., McKnight W.B., Ketcham A.S. // *Surg. Gynaecol. Obstet.* 1965. V. 121. P. 538–544.
141. Masters A., Bown S.G. // *Br. J. Cancer.* 1992. V. 8. P. 242–249.
142. Hirsch L.R., Stafford R.J., Bankson J.A., Sershen S.R., Price R.E., Hazle J.D., Halas N.J., West J.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. P. 13549–13554.
143. Zharov V.P., Galitovsky V., Viegas M. // *Appl. Phys. Lett.* 2003. V. 83. P. 4897–4899.
144. Pitsillides C.M., Joe E.K., Wei X., Anderson R.R., Lin C.P. // *Biophys. J.* 2003. V. 84. P. 4023–4032.
145. von Maltzahn G., Park J.-H., Agrawal A., Bandaru N.K.,

- Das S.K., Sailor M.J., Bhatia S.N. // *Cancer Res.* 2009. V. 69. P. 3892–3900.
146. Lapotko D., Lukianova-Hleb E., Oraevsky A. // *Nanomedicine.* 2007. V. 2. P. 241–253.
147. Huang X., Qian W., El-Sayed I.H., El-Sayed M.A. // *Lasers Surg. Med.* 2007. V. 39. P. 747–753.
148. Lapotko D., Lukianova E., Potapnev M., Aleinikova O., Oraevsky A. // *Cancer Lett.* 2005. V. 239. P. 36–45.
149. Harris N., Ford M.J., Cortie M.B. // *J. Phys. Chem. B.* 2006. V. 110. P. 10701–10707.
150. Huff T.B., Tong L., Zhao Y., Hansen M.N., Cheng J.X., Wei A. // *Nanomedicine.* 2007. V. 2. P. 125–132.
151. Loo C., Lowery A., Halas N.J., West J.L., Drezek R. // *Nano Lett.* 2005. V. 5. P. 709–711.
152. Hu M., Petrova H., Chen J., McLellan J.M., Siekkinen A.R., Marquez M., Li X., Xia Y., Hartland G.V. // *J. Phys. Chem. B.* 2006. V. 110. P. 1520–1524.
153. Chen J., Wang D., Xi J., Au L., Siekkinen A., Warsen A., Li Z.-Y., Zhang H., Xia Y., Li X. // *Nano Lett.* 2007. V. 7. P. 1318–1322.
154. Terentyuk G.S., Maslyakova G.N., Suleymanova L.V., Khlebtsov N.G., Khlebtsov B.N., Akchurin G.G., Maksimova I.L., Tuchin V.V. // *J. Biomed. Opt.* 2009. V. 14. P. 021016.
155. Lapotko D. // *Nanomedicine.* 2009. V. 4. P. 253–256.
156. Hleb E., Hu Y., Drezek R., Hafner J., Lapotko D. // *Nanomedicine.* 2008. V. 3. P. 797–812.
157. Zharov V.P., Galitovskaya E.N., Johnson C., Kelly T. // *Lasers Surg. Med.* 2005. V. 37. P. 219–226.
158. Akchurin G., Khlebtsov B., Akchurin G., Tuchin V., Zharov V., Khlebtsov N. // *Nanotechnology.* 2008. V. 19. P. 015701.
159. Hleb E.Y., Lapotko D.O. // *Nanotechnology.* 2008. V. 19. P. 355702.
160. Lukianova-Hleb E.Y., Anderson L.J.E., Lee S., Hafner J.H., Lapotko D.O. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2010. V. 12. P. 12237–12244.
161. Jain R.K., Booth M.F. // *J. Clin. Invest.* 2003. V. 112. P. 1134–1136.
162. Nie S.M. // *Nanomedicine.* 2010. V. 5. P. 523–528.
163. El-Sayed I.H., Huang X., El-Sayed M.A. // *Cancer Lett.* 2006. V. 239. P. 129–135.
164. Visaria R.K., Griffin R.J., Williams B.W., Ebbini E.S., Paciotti G.F., Song C.W., Bischof J.C. // *Mol. Cancer Ther.* 2006. V. 5. P. 1014–1020.
165. Larson T.A., Bankson J., Aaron J., Sokolov K. // *Nanotechnology.* 2007. V. 18. P. 325101.
166. Lu W., Xiong C., Zhang G., Huang Q., Zhang R., Zhang J.Z., Li C. // *Clin. Cancer Res.* 2009. V. 15. P. 876–886.
167. Huang X., Peng X., Wang Y., Wang Y., Shin D.M., El-Sayed M.A., Nie S. // *ACS Nano.* 2011. V. 4. P. 5887–5896.
168. Kirpotin D.B., Drummond D.C., Shao Y., Shalaby M.R., Hong K., Nielsen U.B., Marks J.D., Benz C.C., Park J.W. // *Cancer Res.* 2006. V. 66. P. 6732–6740.
169. Choi C.H.J., Alabi C.A., Webster P., Davis M.E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. P. 1235–1240.
170. *Handbook of Photonics for Biomedical Science / Ed. V.V. Tuchin.* Boca Raton: CRC Press, 2009. 868 p.
171. Hainfeld J.F., Slatkin D.N., Smilowitz H.M. // *Phys. Med. Biol.* 2004. V. 49. P. N309–N315.
172. Pissuwan D., Valenzuela S.M., Miller C.M., Cortie M.B. // *Nano Lett.* 2007. V. 7. P. 3808–3812.
173. Zharov V.P., Mercer K.E., Galitovskaya E.N., Smeltzer M.S. // *Biophys. J.* 2006. V. 90. P. 619–627.
174. Pissuwan D., Valenzuela S.M., Cortie M.B. // *Trends Biotech.* 2006. V. 24. P. 62–67.
175. *Cancer Nanotechnology. Methods and Protocols / Eds S.R. Grobmyer, B.M. Moudgil. N.-Y.: Humana Press, 2010. 396 p.*
176. Wilson B.C. // *Handbook of Photonics for Biomedical Science / Ed. V.V. Tuchin.* Boca Raton: CRC Press, 2010. P. 649–686.
177. Lakowicz J.R., Ray K., Chowdhury M., Szmecinski H., Fu Y., Zhang J., Nowaczyk K. // *Analyst.* 2008. V. 133. P. 1308–1346.
178. Bardhan R., Grady N.K., Cole J.R., Joshi A., Halas N.J. // *ACS Nano.* 2009. V. 3. P. 744–752.
179. Sershen S.R., Westcott S.L., Halas N.J., West J.L. // *J. Biomed. Mater. Res.* 2000. V. 51. P. 293–298.
180. Radt B., Smith T.A., Caruso F. // *Adv. Mater.* 2004. V. 16. P. 2184–2189.
181. Shiotani A., Mori T., Niidome T., Niidome Y., Katayama Y. // *Langmuir.* 2007. V. 23. P. 4012–4018.
182. Nakamura T., Tamura A., Murotani H., Oishi M., Jinji Y., Matsuishi K., Nagasaki Y. // *Nanoscale.* 2010. V. 2. P. 739–746.
183. Thomas K.G., Kamat P.V. // *Acc. Chem. Res.* 2003. V. 36. P. 888–898.
184. Liu S.Y., Liang Z.S., Gao F., Luo S.F., Lu G.Q. // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2010. V. 21. P. 665–674.
185. Bardhan R., Chen W., Bartels M., Perez-Torres C., Botero M.F., McAninch R.W., Contreras A., Schiff R., Pautler R.G., Halas N.J., Joshi A. // *Nano Lett.* 2010. V. 10. P. 4920–4928.
186. Kuo W.-S., Chang C.-N., Chang Y.-T., Yang M.-H., Chien Y.-H., Chen S.-J., Yeh C.-S. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010. V. 49. P. 2711–2715.
187. Abraham G.E., Himmel P.B. // *J. Nutr. Med.* 1997. V. 7. P. 295–305.
188. Abraham G.E. // *Orig. Intern.* 2008. V. 15. P. 132–158.
189. Tsai C.Y., Shiau A.L., Chen S.Y., Chen Y.H., Cheng P.C., Chang M.Y., Chen D.H., Chou C.H., Wang C.R., Wu C.L. // *Arthritis Rheum.* 2007. V. 56. P. 544–554.
190. Brown C.L., Whitehouse M.W., Tiekink E.R.T., Bushell G.R. // *Inflammopharmacology.* 2008. V. 16. P. 133–137.
191. Paciotti G.F., Myer L., Weinreich D., Goia D., Pavel N., McLaughlin R.E., Tamarkin L. // *Drug Deliv.* 2004. V. 11. P. 169–183.
192. Paciotti G.F., Kingston D.G.I., Tamarkin L. // *Drug Dev. Res.* 2006. V. 67. P. 47–54.
193. Mukherjee P., Bhattacharya R., Wang P., Wang L., Basu S., Nagy J.A., Atala A., Mukhopadhyay D., Soker S. // *Clin. Cancer Res.* 2005. V. 11. P. 3530–3534.
194. Mukherjee P., Bhattacharya R., Bone N., Lee Y.K., Patra C.R., Wang S., Lu L., Secreto C., Banerjee P.C., Yaszemski M.J., Kay N.E., Mukhopadhyay D. // *J. Nanobiotechnology.* 2007. V. 5. <http://www.jnanobiotechnology.com/content/5/1/4>
195. Bhattacharya R., Patra C.R., Verma R., Kumar S., Greipp P.R., Mukherjee P. // *Adv. Mater.* 2007. V. 19. P. 711–716.
196. Duncan B., Kim C., Rotello V.M. // *J. Control. Release.* 2010. V. 148. P. 122–127.
197. Pissuwan D., Niidome T., Cortie M.B. // *J. Control. Release.* 2011. V. 149. P. 65–71.
198. Chen Y.H., Tsai C.Y., Huang P.Y., Chang M.Y., Cheng P.C., Chou C.H., Chen D.H., Wang C.R., Shiau A.L., Wu C.L. // *Mol. Pharm.* 2007. V. 4. P. 713–722.
199. Li J., Wang X., Wang C., Chen B., Dai Y., Zhang R., Song M., Lv G., Fu D. // *ChemMedChem.* 2007. V. 2. P. 374–378.
200. Patra C.R., Bhattacharya R., Wang E., Katarya A., Lau J.S., Dutta S., Muders M., Wang S., Buhrow S.A., Safgren S.L., Yaszemski M.J., Reid J.M., Ames M.M., Mukherjee P,

- Mukhopadhyay D. // *Cancer Res.* 2008. V. 68. P. 1970–1978.
201. Podsiadlo P., Sinani V.A., Bahng J.H., Kam N.W., Lee J., Kotov N.A. // *Langmuir.* 2008. V. 24. P. 568–574.
202. Azzam E.M.S., Morsy S.M.I. // *J. Surf. Deterg.* 2008. V. 11. P. 195–199.
203. Stiti M., Cecchi A., Rami M., Abdaoui M., Barragan-Montero V., Scozzafava A., Guari Y., Winum J.Y., Supuran C.T. // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. V. 130. P. 16130–16131.
204. Agasti S.S., Chompoosor A., You C.C., Ghosh P., Kim C.K., Rotello V.M. // *J. Am. Chem. Soc.* 2009. V. 131. P. 5728–5729.
205. Dhar S., Daniel W.L., Giljohann D.A., Mirkin C.A., Lippard S.J. // *J. Am. Chem. Soc.* 2009. V. 131. P. 14652–14653.
206. Hosta L., Pla-Roca M., Arbiol J., López-Iglesias C., Samitier J., Cruz L.J., Kogan M.J., Albericio F. // *Bioconjug. Chem.* 2009. V. 20. P. 138–146.
207. Dreaden E.C., Mwakwari S.C., Sodji Q.H., Oyelere A.K., El-Sayed M.A. // *Bioconjug. Chem.* 2009. V. 20. P. 2247–2253.
208. Eghtedari M., Liopo A.V., Copland J.A., Oraevsky A.A., Motamedi M. // *Nano Lett.* 2009. V. 9. P. 287–291.
209. Asadishad B., Vossoughi M., Alemzadeh I. // *Ind. Eng. Chem. Res.* 2010. V. 49. P. 1958–1963.
210. Староверов С.А., Гасина О.А., Кладиев А.А., Богатырев В.А. // *Российский биотерапевтический журн.* 2010. Т. 9. С. 22–23.
211. Kim C.-K., Ghosh P., Rotello V.M. // *Nanoscale.* 2009. V. 1. P. 61–67.
212. Gu H., Ho P.L., Tong E., Wang L., Xu B. // *Nano Lett.* 2003. V. 3. P. 1261–1263.
213. Rosemary M.J., MacLaren I., Pradeep T. // *Langmuir.* 2006. V. 22. P. 10125–10129.
214. Selvaraj V., Alagar M. // *Int. J. Pharm.* 2007. V. 337. P. 275–281.
215. Saha B., Bhattacharya J., Mukherjee A., Ghosh A.K., Santra C.R., Dasgupta A.K., Karmakar P. // *Nanoscale Res. Lett.* 2007. V. 2. P. 614–622.
216. Grace A.N., Pandian K. // *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects.* 2007. V. 297. P. 63–70.
217. Grace A.N., Pandian K. // *J. Bionanosci.* 2007. V. 1. P. 96–105.
218. Burygin G.L., Khlebtsov B.N., Shantrokha A.N., Dykman L.A., Bogatyrev V.A., Khlebtsov N.G. // *Nanoscale Res. Lett.* 2009. V. 4. P. 794–801.
219. Rai A., Prabhune A., Perry C.C. // *J. Mater. Chem.* 2010. V. 20. P. 6789–6798.
220. Nie Z., Liu K.J., Zhong C.J., Wang L.F., Yang Y., Tian Q., Liu Y. // *Free Radic. Biol. Med.* 2007. V. 43. P. 1243–1254.
221. Bowman M.C., Ballard T.E., Ackerson C.J., Feldheim D.L., Margolis D.M., Melander C. // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. V. 130. P. 6896–6897.
222. Joshi H.M., Bhumkar D.R., Joshi K., Pokharkar V., Sastry M. // *Langmuir.* 2006. V. 22. P. 300–305.
223. Chamberland D.L., Agarwal A., Kotov N., Fowlkes J.B., Carson P.L., Wang X. // *Nanotechnology.* 2008. V. 19. P. 095101.
224. Miller A.D. // *Nature.* 1992. V. 357. P. 455–460.
225. Зеленин А.В. // *Вестник РАН.* 2001. Т. 71. С. 387–395.
226. Patel P.C., Giljohann D.A., Daniel W.L., Zheng D., Prigodich A.E., Mirkin C.A. // *Bioconjug. Chem.* 2010. V. 21. P. 2250–2256.
227. Зильбер Л.А., Фризе В.В. // *Журн. эксп. биологии.* 1929. Т. 11. С. 128–135.
228. Pacheco G. // *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1925. V. 18. P. 119–149.
229. Ковалев И.Е., Полевая О.Ю. *Биохимические основы иммунитета к низкомолекулярным химическим соединениям.* М.: Наука, 1985. 304 с.
230. Shiosaka S., Kiyama H., Wanaka A., Tohyama M. // *Brain Res.* 1986. V. 382. P. 399–403.
231. Дыкман Л.А., Староверов С.А., Богатырев В.А., Щёголев С.Ю. // *Российские нанотехнологии.* 2010. Т. 5. С. 58–68.
232. Pow D.V., Crook D.K. // *J. Neurosci. Meth.* 1993. V. 48. P. 51–63.
233. Демениев В.А., Щинова М.А., Иванов Л.И., Воробьева Р.Н., Здановская Н.И., Небайкина Н.В. // *Вопр. вирусол.* 1996. Т. 41. С. 107–110.
234. Zhao Z., Wakita T., Yasui K. // *J. Virol.* 2003. V. 77. P. 4248–4260.
235. Dykman L.A., Staroverov S.A., Bogatyrev V.A., Shchyogolev S.Yu. *Gold nanoparticles as an antigen carrier and an adjuvant.* New York: Nova Science Publishers, 2010. 54 p.
236. Staroverov S.A., Aksinenko N.M., Gabalov K.P., Vasilenko O.A., Vidyasheva I.V., Shchyogolev S.Yu., Dykman L.A. // *Gold Bull.* 2009. V. 42. P. 153–156.
237. Vallhov H., Qin J., Johansson S.M., Ahlborg N., Muhammed M.A., Scheynius A., Gabriellson S. // *Nano Lett.* 2006. V. 6. P. 1682–1686.
238. Villiers C.L., Freitas H., Couderc R., Villiers M.-B., Marche P.N. // *J. Nanopart. Res.* 2010. V. 12. P. 55–60.
239. Zolnik B.S., González-Fernández A., Sadrieh N., Dobrovolskaia M.A. // *Endocrinology.* 2010. V. 151. P. 458–465.
240. Bastús N.G., Sánchez-Tilló E., Pujals S., Farrera C., Kogan M.J., Giralt E., Celada A., Lloberas J., Puntès V. // *Mol. Immunol.* 2009. V. 46. P. 743–748.
241. Yen H.J., Hsu S.H., Tsai C.L. // *Small.* 2009. V. 5. P. 1553–1561.
242. Dobrovolskaia M.A., McNeil S.E. // *Nat. Nanotechnol.* 2007. V. 2. P. 469–478.
243. Lou H., Tian Y., Gao J.-Q., Deng S.-Y., Li J.-L. // *J. Foshan Univ.* 2007. V. 25. P. 24–27.
244. Lewinski N., Colvin V., Drezek R. // *Small.* 2008. V. 4. P. 26–49.
245. Alkilany A.M., Murphy C.J. // *J. Nanopart. Res.* 2010. V. 12. P. 2313–2333.
246. Fadeel B., Garcia-Bennett A.E. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2010. V. 62. P. 362–374.
247. Johnston H.J., Hutchison G., Christensen F.M., Peters S., Hankin S., Stone V. // *Crit. Rev. Toxicol.* 2010. V. 40. P. 328–346.
248. Khlebtsov N.G., Dykman L.A. // *Chem. Soc. Rev.* 2011. V. 40. P. 1647–1671.
249. Nam J.M., Thaxton C.S., Mirkin C.A. // *Science.* 2003. V. 301. P. 1884–1886.
250. Jiang W., Kim B.Y.S., Rutka J.T., Chan W.C.W. // *Nat. Nanotechnol.* 2008. V. 3. P. 145–150.

УДК 575.22:340.6

Характеристика популяций Российской Федерации по панели пятнадцати локусов, используемых для ДНК-идентификации и в судебно-медицинской экспертизе

В. А. Степанов^{1,6*}, О. П. Балановский^{2,5}, А. В. Мельников³, А. Ю. Лаш-Завада³, В. Н. Харьков^{1,6}, Т. В. Тяжелова², В. Л. Ахметова⁴, О. В. Жукова², Ю. В. Шнейдер², И. Н. Шильникова², С. А. Боринская², А. В. Марусин¹, М. Г. Спиридонова¹, К. В. Симонова¹, И. Ю. Хитринская¹, М. О. Раджабов⁷, А. Г. Романов⁵, О. В. Штыгашева⁸, С. М. Кошель⁹, Е. В. Балановская⁵, А. В. Рыбакова³, Э. К. Хуснутдинова⁴, В. П. Пузырев¹, Н. К. Янковский²

¹Научно-исследовательский институт медицинской генетики СО РАМН, 634050, Томск, Набережная реки Ушайки, 10

²Учреждение Российской академии наук Институт общей генетики РАН, 119991, Москва, ул. Губкина, 3

³Экспертно-криминалистический центр Министерства внутренних дел Российской Федерации, 125130, Москва, ул. А. и З. Космодемьянских, 5

⁴Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, 450054, Уфа, просп. Октября, 71

⁵Медико-генетический научный центр Российской академии медицинских наук, 115478, Москва, ул. Москворечье, 1

⁶ООО «Геномная диагностика», 634055, Томск, просп. Академический, 17

⁷Дагестанский государственный университет, 367000, Махачкала, ул. Гаджиева, 43а

⁸Хакасский государственный университет им. Н.Ф. Катанова, 655017, Абакан, ул. Ленина, 92

⁹Географический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1

*E-mail: vadim.stepanov@medgenetics.ru

Поступила в редакцию 05.03.2011 г.

РЕФЕРАТ Впервые с использованием панели из 15 генетических маркеров, применяемых для ДНК-идентификации и в судебно-медицинской экспертизе, охарактеризованы 17 популяций Российской Федерации. Определена степень полиморфизма и популяционной изменчивости в российских популяциях микросателлитных локусов, входящих в набор PowerPlex 16 («Promega»): распределение аллелей и генотипов в популяциях шести городов и 11 этнических группах РФ; уровни внутри- и межпопуляционной генетической дифференциации населения; генетические взаимоотношения между популяциями; идентификационные и судебно-медицинские характеристики изученной системы маркеров. Выявлены значительные отличия российских популяций от референтной базы США, используемой в настоящее время в практике судебной экспертизы РФ. Создана база данных по частотам аллелей 15 микросателлитных локусов, применяемых в ДНК-идентификации и судебной медицине, которая может стать референтной для проведения судебно-медицинских экспертиз в России. Обнаружена пространственная организация генетического разнообразия по панели STR-маркеров, используемых для ДНК-идентификации, отражающая общие закономерности географической кластеризации популяций человека по генетическим маркерам различного типа. Обоснована необходимость учета популяционно-генетической структуры населения при судебно-медицинских исследованиях и ДНК-идентификации личности в криминалистике.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА микросателлиты, короткие tandemные повторы, частоты аллелей, судебно-медицинская экспертиза, ДНК-идентификация, население России, референтная база данных, генетическое разнообразие, геногеография.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ МВД РФ – Министерство внутренних дел Российской Федерации; ПЦР – полимеразная цепная реакция; *He* – ожидаемая гетерозиготность; AMOVA (Analysis of MOlecular VAriance) – анализ молекулярной дисперсии; CODIS (Combined DNA Index System) – комбинированный индекс ДНК; EDNAP (the European DNA Profiling Group) – европейская группа профилирования ДНК; ENFSI (the European Network of Forensic Science Institutes) – европейская сеть судебно-медицинских институтов; ESS (European Standard Set) – европейский стандартный набор; MP (Matching Probability) – вероятность случайного совпадения генотипов; PD (Power of Discrimination) – вероятность дискриминации неродственных индивидов; PE (Power of Exclusion) – исключаяющая способность; PI (Paternity Index) – индекс отцовства; SNP (Single Nucleotide Polymorphism) – однонуклеотидный полиморфизм; STR (Short Tandem Repeats) – короткие tandemные повторы; UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) – метод невзвешенного попарного арифметического среднего.

ВВЕДЕНИЕ

Методы молекулярно-генетического анализа широко используются для идентификации биологических образцов индивидов: жертв преступлений, катастроф, террористических актов; преступников; контингентов специальных подразделений армии и сил правопорядка. Генетический анализ ДНК в медико-криминалистической экспертизе проводится в два этапа. На первом этапе устанавливают характеристики ДНК из образцов, собранных на месте преступления. На втором этапе сравнивают их с характеристиками ДНК, полученными от подозреваемых или родственников жертв. Несовпадение генотипов указывает на то, что исследуемые образцы не принадлежат данному индивиду (учитывая вероятность исключений). При совпадении генотипов учитывается вероятность их случайного совпадения, т.е. вероятность того, что иные лица могут обладать такими же генотипами.

Вероятность такого случайного совпадения вычисляется на основе данных о частотах встречаемости аллелей (и генотипов) анализируемой панели генетических маркеров в референтных популяциях. Для создания таких референтных баз данных используют популяционные выборки, собранные с учетом популяционно-генетической структуры конкретных этнотерриториальных групп. Частоты аллелей в различных популяциях и группах публикуются и представляются в базах данных. Эти справочные базы и служат юридически полноценной основой для судебно-медицинских заключений по интерпретации результатов сравнения генотипов.

Однако достоверность и эффективность ДНК-идентификации зависит от двух важнейших факторов – от выбора панели локусов и от выбора референтной популяции.

Выбор панели локусов. Генетические маркеры, используемые для медико-криминалистической экспертизы, должны быть высоко полиморфными и обладать большой разрешающей способностью. Наиболее эффективными оказались мультиаллельные (насчитывающие в основном 8–10 аллелей) несцепленные микросателлитные маркеры – STR (Short

Tandem Repeats)-локусы. Однако в разных регионах используются разные панели таких STR-маркеров.

В Европе Интерпол использовал два стандарта наборов локусов – ENFSI (the European Network of Forensic Science Institutes) и EDNAP (the European DNA Profiling Group), включавших по семь STR-локусов. В 2005 г. было принято соглашение об унификации системы локусов, используемой в Европе, и ENFSI предложил еще шесть STR-маркеров – кандидатов для включения в европейский стандартный набор – ESS [1]. В 2009 г. ENFSI включил в свой стандарт пять из шести маркеров-кандидатов, расширив, тем самым, европейскую стандартную панель ESS до 12 STR: *TH01*, *vWA*, *D18S51*, *D8S1179*, *D3S1358*, *FGA*, *D21S11*, *D1S1656*, *D2S441*, *D10S1248*, *D12S391* и *D22S1405*. В 2010 году этот стандарт был утвержден Евросоюзом.

В США в качестве стандарта с 1994 г. применяется система CODIS (Combined DNA Index System), включающая в полном формате 13 локусов (*D7S820*, *D13S317*, *CSF1PO*, *TPOX*, *D16S539*, *TH01*, *vWA*, *D5S818*, *D18S51*, *D8S1179*, *D3S1358*, *FGA*, *D21S1*). При этом системы CODIS и ENFSI пересекаются по семи маркерам из первичного стандарта EDNAP/ENFSI.

Во всех этих системах, кроме полиморфных аутосомных STR-локусов, используется еще один локус (амелогенин), размер ПЦР-фрагментов которого отличается на X- и Y-хромосомах, что позволяет определять пол индивида по анализу ДНК биологического образца.

При создании этих систем среди десятков проверенных STR-локусов выбирали наиболее высокополиморфные в большинстве обследованных популяций. Для удобства генотипирования был разработан набор (PowerPlex 16), позволяющий амплифицировать одновременно 16 полиморфных локусов в одной пробирке, что значительно упрощает и удешевляет анализ. Кроме амелогенинового локуса и 13 локусов системы CODIS в этот набор входят еще два высокополиморфных и хорошо читаемых пентануклеотидных маркера – *PentaD* и *PentaE* [2].

В России 3 декабря 2008 г. был принят Федеральный закон Российской Федерации «О государствен-

ной геномной регистрации в Российской Федерации», предусматривающий создание Федеральной базы данных геномной информации в рамках МВД РФ. Ведомственным нормативным актом, регулирующим процедуры генотипирования в целях ДНК-идентификации, является приказ МВД РФ № 70 от 10.02.2006, который в редакции от 21.05.2008 устанавливает в качестве обязательного набор из 12 STR-маркеров и локуса амелогенина, полностью аналогичный американскому стандарту CODIS.

Выбор референтной популяции. Для достоверности сравнения генотипов в каждом конкретном случае выбор референтной популяции должен зависеть от того, к какой группе лиц принадлежит индивид, оставивший биологические следы. На практике же референтную популяцию приходится выбирать среди представленных в криминалистических базах популяций, изученных с использованием данной панели STR-маркеров.

Чем меньше референтная популяция отражает генофонд тестируемой группы, тем больше индивидов в ней имеют аллели, отсутствующие в референтной базе данных, что приводит к значительному снижению дискриминирующей способности метода. Существует корреляция между числом (процентом) индивидов с аллелями, отсутствующими в референтной популяции, и генетическим расстоянием между референтной и анализируемой популяциями [3].

Использование неадекватной референтной группы может привести к снижению итоговой вероятности идентификации на несколько порядков. Ситуацию улучшает введение поправок, основанных на максимальной степени генетических различий между субпопуляциями в пределах референтной популяции (например, этнической группы). Для введения такой поправки необходимо иметь информацию о генетической дифференциации популяций (F_{st}) по используемым локусам для каждой конкретной группы на каждой конкретной территории. Эта поправка позволяет вместо неизвестных для референтной популяции аллелей и генотипов подставить их расчетные частоты с учетом степени дифференциации F_{st} [4]. Предполагается, что такие расчетные частоты учитывают максимально возможные отличия между неизвестной и референтной популяциями.

Даже когда неизвестно, к какой группе относится индивид, которому принадлежит биологический образец, при наличии популяционных баз данных его можно идентифицировать с определенной вероятностью. Так, например, при идентификации жертв террористической атаки Всемирного торгового центра в Нью-Йорке для тех останков, принадлежность которых к какой-либо группе заранее была неизвестна, вычисление вероятности проводилось с использова-

нием в качестве референтных всех основных четырех американских групп, а в качестве итоговой давалась самая консервативная оценка [5]. Через 4 года из 2749 останков было идентифицировано 1594, при этом 850 из них – на основе только данных анализа ДНК [5].

Разработка криминалистических баз данных и критериев сравнения проводится с учетом генетических характеристик этнотерриториальных групп (см., например, [4]) и публикуется согласно определенным правилам [6].

В США и Европе большой массив популяций охарактеризован по локусам, используемым в медико-криминалистической экспертизе. В других регионах также известны десятки популяций, изученных по панелям генетических маркеров ENFSI, EDNAP, CODIS [7–14].

Однако данные о распределении отдельных генетических маркеров из этих панелей в российских популяциях фрагментарны [15–18]. Особенность России с точки зрения интерпретируемости данных при ДНК-идентификации состоит в ее многонациональности и большой протяженности территории. Хорошо известны значительные различия в спектре индивидуальных особенностей геномов, характерных для различных этнических групп, особенно пространственно удаленных. Многочисленные популяционно-генетические исследования населения России, выполненные с использованием разных систем генетических маркеров, включая мтДНК, Y-хромосому и аутосомные маркеры, показали, что размах межпопуляционной изменчивости разных этнических и территориальных групп РФ существенно превосходит изменчивость всего народонаселения Европы [19–22]. Однако из-за отсутствия систематической информации о населении РФ по общепринятым в мире панелям маркеров, в практике ДНК-идентификации в РФ используются данные о частотах генетических характеристик у населения США и Европы, хотя приложимость этих данных к населению РФ не оценивалась.

В связи с этим, цель нашей работы состояла в определении частот аллелей 15 аутосомных STR-локусов из набора PowerPlex 16 в шести городских популяциях и 11 этнических группах РФ. Решение этой задачи позволит охарактеризовать генетическое разнообразие населения России по этой системе маркеров и заложит основы для создания собственной референтной популяции для ДНК-идентификации и судебно-медицинской экспертизы в России.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Популяции

Обследованы 17 популяций общей численностью 1156 человек, представляющих различные географиче-

ские регионы России (Европейская часть РФ, Северный Кавказ, Волго-Уральский регион, Сибирь) и принадлежащих к различным лингвистическим группам и различным антропологическим типам.

Шесть выборок представляют городское русское население: Москва ($N = 60$), Белгород ($N = 50$), Орел ($N = 51$), Оренбург ($N = 50$), Ярославль ($N = 50$), Томск ($N = 185$). Одиннадцать выборок представляют широкий спектр народов России и сопредельных стран: коми ($N = 50$), марийцы ($N = 52$), хакасы ($N = 92$), башкиры ($N = 70$), татары ($N = 61$), чувашаи ($N = 53$), даргинцы ($N = 48$), аварцы ($N = 50$), лезгины ($N = 50$), украинцы ($N = 138$), белорусы ($N = 46$).

Молекулярно-биологические методы

Аmplификацию 15 STR-локусов и маркера – гена амелогенина – проводили в формате мультиплексной ПЦР (один мультиплекс на все 16 локусов) на градиентных амплификаторах Applied Biosystems и Biometra в условиях, рекомендуемых производителем коммерческого набора PowerPlex («Promega»). Флуоресцентно меченные ПЦР-фрагменты разделяли методом капиллярного гель-электрофореза на генетических анализаторах ABIPrism 3130 и ABIPrism 310 («Applied Biosystems»). Чтение генотипов проводили с помощью программного обеспечения Gene Mapper («Applied Biosystems»). Качество генотипирования контролировали, используя стандартный набор аллелей всех 16 микросателлитов («лэддер»), поставляемый в составе набора PowerPlex 16, загружая «лэддер» в каждом цикле генотипирования (в каждом прогоне).

Методы статистической обработки результатов

Данные анализировали с использованием современных статистических подходов, применяемых в популяционной генетике и судебной медицине. Соответствие наблюдаемого распределения генотипов равновесию Харди–Вайнберга оценивали с использованием точного теста по Гуо и Томпсону [23], реализованного в пакетах Arlequin и GenePop. Генетическое разнообразие популяций и генетическую вариабельность 15 STR анализировали с помощью пакета Arlequin [24]. Для анализа генетической дифференциации популяций применяли расчет попарных значений F_{st} и анализ молекулярной дисперсии (AMOVA), используя в качестве матрицы генетических расстояний матрицу среднеквадратичных различий в числе повторов R_{st} . Дендрограмму генетических взаимоотношений между популяциями строили методом невзвешенного попарного среднего (UPGMA) в пакете программ PHYLIP.

Изменчивость изучаемых локусов в населении Северной Евразии анализировали при помощи составленной нами базы данных по частотам набора микро-

сателлитных маркеров в 51 популяции (суммарный объем выборки – 8700 человек). База данных включала как наши собственные результаты, представленные в данной работе, так и результаты предшествующих исследований [25–39], в том числе данные по населению 12 стран (Белоруссия, Босния, Греция, Китай, Македония, Монголия, Пакистан, Польша, Россия, Словакия, Швеция, Чехия). База содержит информацию по 17 локусам (*D3S1358*, *TH01*, *D21S11*, *D18S51*, *D13S317*, *D7S820*, *D16S539*, *CSF1PO*, *vWA*, *D8S1179*, *TPOX*, *FGA*, *D5S818*, *PentaD*, *PentaE*, *D2S1338*, *D19S433*). Однако, поскольку пять маркеров (*D5S818*, *PentaD*, *PentaE*, *D2S1338*, *D19S433*) в ряде популяций не были изучены, в анализе использованы остальные 12 локусов.

Анализ этого обширного массива проведен с использованием как статистических, так и картографических методов географии. Статистический анализ включил расчет генетических расстояний по Нею [40] с использованием программы DJgenetic, разработанной Ю.А. Серегиним и Е.В. Балановской. Для визуализации полученной матрицы генетических расстояний на графике многомерного шкалирования применяли программу Statistica 6.0 (StatSoft. Inc., 2001) [41].

Также была рассчитана гетерозиготность по каждому локусу и получены усредненные (по 12 локусам) величины гетерозиготности в каждой популяции. Эти величины картографировали с использованием программы GeneGeo, в течение ряда лет разрабатываемой членами коллектива авторов. Расчет интерполированных значений гетерозиготности проведен по данным в опорных точках (непосредственно в изученных популяциях) на равномерную сетку, состоящую из 335661 узла (881×381), после исключения акваторий остался 301681 узел. Интерполяция проведена методом Шепарда (Generalized Shepard's Method). Использована третья степень весовой функции, т.е. вклад каждой точки в рассчитываемое значение в данном узле был обратно пропорционален кубу расстояния между опорной точкой и узлом; опорные точки, удаленные от узла более чем на 3000 км, не учитывали.

Дискриминационный потенциал системы из 15 микросателлитов оценивали с помощью стандартных судебно-медицинских показателей, включающих вероятность случайного совпадения генотипов (MP, Matching Probability), вероятность дискриминации неродственных индивидов (PD, Power of Discrimination), исключющую способность (PE, Power of Exclusion) и индекс отцовства (PI, Paternity Index) [42].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Генетическая вариабельность 15 STR PowerPlex 16

Набор PowerPlex 16, предназначенный для определения индивидуального генетического профиля, кроме

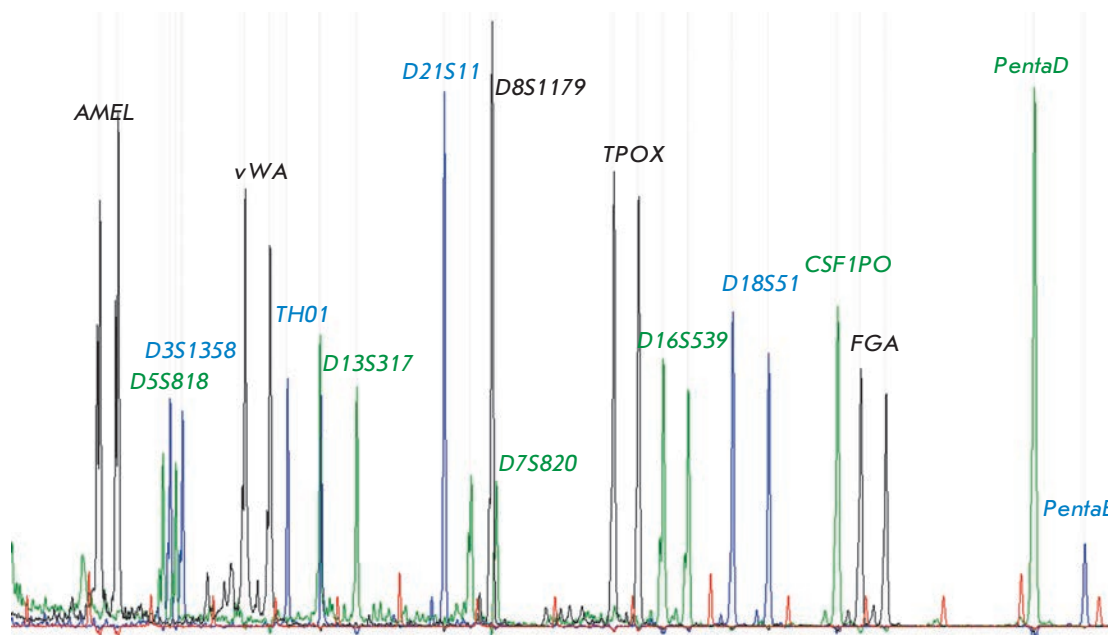


Рис. 1. Мультиплексное генотипирование 15 микросателлитов и локуса амелогенина (AMEL) из набора PowerPlex 16 («Promega») методом капиллярного электрофореза.

Таблица 1. Генетическая вариабельность 15 STR из набора PowerPlex 16

Локус	Ожидаемая гетерозиготность	Ожидаемая гетерозиготность в среднем на популяцию	Число аллелей	Число аллелей в среднем на популяцию	Разброс числа повторов	Разброс числа повторов в среднем на популяцию
D3S1358	0.77543	0.76634	8	5.647	7	4.765
TH01	0.78141	0.76693	8	5.588	6	3.588
D21S11	0.84974	0.84229	17	10.588	9	6.353
D18S51	0.87419	0.86735	18	11.882	16	11.118
PentaE	0.91497	0.90474	18	15.176	18	16.118
D5S818	0.73859	0.73546	9	6.529	8	5.941
D13S317	0.79676	0.78925	10	7.176	9	6.176
D7S820	0.80174	0.79478	12	7.471	10	6.471
D16S539	0.78966	0.78064	9	7.000	7	5.941
CSF1PO	0.73503	0.73035	8	5.882	7	5.059
PentaD	0.82446	0.82034	13	8.588	17	8.588
vWA	0.79355	0.79053	10	7.176	9	6.235
D8S1179	0.79676	0.79044	11	8.471	10	7.647
TPOX	0.61227	0.60398	8	5.294	7	4.412
FGA	0.85811	0.85062	20	10.941	13	8.882
Среднее на локус	0.79618	0.78893	11.933	8.227	10.200	7.153

15 несцепленных аутомсомных STR-маркеров, включает и маркер гена амелогенина, расположенный на X- и Y-хромосомах и необходимый для определения пола. На рис. 1 показан пример мультиплексного генотипирования амелогенина и 15 микросателлитов набора PowerPlex 16 в одном из образцов. В этом анализ проводили только с использованием панели микросателлитных маркеров (15 STR).

Результаты изучения генетической вариабельности этих 15 STR в России и сопредельных странах

приведены в табл. 1. Средний уровень внутривидового генетического разнообразия (ожидаемой гетерозиготности, H_e) 15 STR в изученных популяциях составил 0.796. При этом наиболее вариабельные локусы ($H_e > 0.85$) – D21S11, D18S51, PentaE и FGA – имеют больше 15 аллелей. Наибольшее число аллелей обнаружено в локусах FGA (20), PentaE (18) и D18S51 (18).

Наибольшим разбросом числа повторов характеризуются пентануклеотидные микросателлиты

PentaE (разница в 18 повторов между самым коротким и самым длинным аллелями) и *PentaD* (разброс в 17 повторов). Наименее полиморфный маркер ($H_e = 0.612$) – *TPOX* – имеет восемь аллелей. Ожидаемая гетерозиготность остальных 10 микросателлитов набора PowerPlex 16 варьирует в пределах $0.74 < H_e < 0.82$ с числом выявленных аллелей от 8 до 12.

Распределение аллелей и генотипов в популяциях

В исследованных популяциях из 255 распределений генотипов (15 локусов в 17 выборках) отклонение от равновесия Харди–Вайнберга (ПХВ) ($p < 0.05$) обнаружено лишь у 21. Накопление отклонений от равновесия Харди–Вайнберга обнаружено лишь в популяции Томска (пять локусов из 15). Однако при введении поправки Бонферрони на множественность сравнений фактический уровень значимости для набора из 15 тестов в популяции равен 0.0035; поэтому с учетом поправки Бонферрони лишь одно отклонение от равновесия Харди–Вайнберга (локус *FGA* в популяции Томска) оказалось статистически значимым.

Пример распределения аллелей в популяциях (локус *D7S820* в шести российских городах) представлен на рис. 2. Показатели генетической вариабельности 17 популяций по 15 микросателлитам суммированы в табл. 2. Все 17 популяций имеют близкий уровень генетического разнообразия (средняя гетерозиготность колеблется в пределах 0.771–0.803). Наиболее высокий уровень генетической вариабельности выявлен в популяциях лезгин, украинцев и жителей Томска, наиболее низкий – у марийцев, хакасов и жителей Орла.

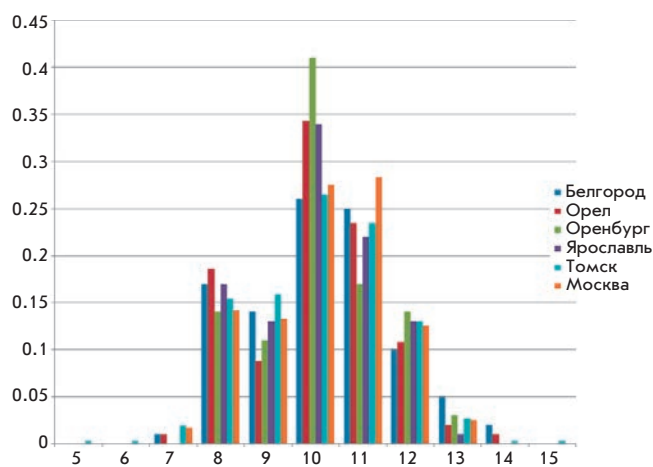


Рис. 2. Распределения аллелей локуса *D7S820* в популяциях шести российских городов. По оси абсцисс указаны аллели (число повторов), по оси ординат – частоты аллелей (в долях от единицы).

Геногеография генетического разнообразия маркеров PowerPlex 16 в Северной Евразии

Используя как наши данные, так и результаты других авторов, представленные в составленной нами базе данных, была рассчитана гетерозиготность 12 локусов (*D3S1358*, *TH01*, *D21S11*, *D18S51*, *D13S317*, *D7S820*, *D16S539*, *CSF1PO*, *vWA*, *D8S1179*, *TPOX*, *FGA*) в 51 популяции России и соседних стран (рис. 3). Хотя все маркеры, входящие в панель PowerPlex 16, подбирались по признаку максимальной внутривнутрипопуляционной изменчивости (в том числе гетерозиготности), популяции разных регионов России различаются по уровню гетерозиготности. Карта показывает, что гетерозиготность максимальна (выше 79%) в популяциях Западной и Центральной Европы и в смежных с ними западных областях стран СНГ. Далее к востоку уровень гетерозиготности постепенно снижается. Так в Европейской части России и в Зауралье он составляет 78%, в Центральной Азии и на Алтае около 77%, в Байкальском регионе – менее 77%. Такая закономерность постепенного убывания гетерозиготности через весь Евразийский континент (от атлантического до тихоокеанского побережий) прослеживается достаточно четко, хотя отдельные популяции могут выпадать из общей тенденции (например, резко снижена гетерозиготность в Костромской популяции). На самом юге отмечается возрастание гетерозиготности почти до максимальных значений, задаваемых популяцией Пакистана.

Долготная тенденция снижения гетерозиготности (с запада на восток Северной Евразии), впервые описанная у маркеров «криминалистической» панели, хорошо известна по классическим геногеографическим исследованиям народонаселения СССР. В работе [43] приведены карты гетерозиготности классических (иммунобиохимических) маркеров, также показывающие снижение разнообразия в направлении от Европейской части к Сибири. Причина снижения гетерозиготности кроется в более интенсивном дрейфе генов у сравнительно малочисленных и изолированных популяций Сибири, тогда как в Восточной и особенно в Западной Европе действие дрейфа генов нивелируется интенсивными миграциями населения.

Генетическая дифференциация популяций

Анализ генетических различий между популяциями, проведенный методом молекулярной дисперсии (AMOVA) с учетом различий в частотах аллелей и дисперсии числа tandemных повторов, выявил значимые генетические различия между группами исследованных популяций. Все русские популяции, украинцы, белорусы и коми характеризуются общностью генного пула по изученным маркерам

Таблица 2. Генетическая вариабельность (ожидаемая гетерозиготность) 17 исследованных популяций по 15 STR набора PowerPlex 16

Локус	Белгород	Орел	Оренбург	Ярославль	Белорусы	Украинцы	Коми	Мари	Томск	Хакасы	Москва	Даргинцы	Лезгины	Аварцы	Башкиры	Татары	Чуваши
D3S1358	0.79434	0.77946	0.77232	0.75394	0.73459	0.79831	0.76929	0.78771	0.78909	0.68603	0.79342	0.77325	0.79535	0.77616	0.72816	0.72917	0.76712
TH01	0.76465	0.76024	0.78586	0.76707	0.78094	0.77249	0.74990	0.72087	0.78202	0.74157	0.75644	0.79518	0.74040	0.78384	0.78479	0.77686	0.77466
D21S11	0.83960	0.83460	0.85556	0.86465	0.86742	0.86777	0.85354	0.84055	0.85443	0.81528	0.85224	0.83224	0.86465	0.82020	0.79486	0.81222	0.84906
D18S51	0.87859	0.86469	0.87859	0.87071	0.86359	0.86551	0.87091	0.84839	0.87784	0.81938	0.88683	0.87149	0.86101	0.87273	0.86608	0.87847	0.87008
PentaE	0.90626	0.90390	0.90081	0.89778	0.89489	0.89926	0.90586	0.90497	0.91035	0.93258	0.90168	0.90548	0.91172	0.84869	0.92415	0.91695	0.91518
D5S818	0.73737	0.72898	0.73172	0.74404	0.74439	0.72419	0.73980	0.75243	0.75267	0.75956	0.71346	0.75022	0.76283	0.74465	0.69681	0.70383	0.71590
D13S317	0.76808	0.79616	0.80889	0.79434	0.81510	0.78100	0.78828	0.80284	0.80313	0.81332	0.77184	0.69825	0.77354	0.79960	0.79589	0.82834	0.77862
D7S820	0.81657	0.77985	0.75838	0.78101	0.78882	0.80208	0.80727	0.77072	0.80964	0.80928	0.79636	0.79232	0.81071	0.77273	0.81470	0.79230	0.80845
D16S539	0.70889	0.76471	0.76626	0.77455	0.77520	0.75109	0.76485	0.77857	0.76974	0.79615	0.77691	0.82456	0.79091	0.80444	0.81048	0.80734	0.80629
CSF1PO	0.73838	0.70938	0.75636	0.72970	0.73865	0.74740	0.76141	0.70874	0.73273	0.74584	0.71527	0.69737	0.67495	0.73172	0.72528	0.76440	0.73836
PentaD	0.82202	0.82392	0.81111	0.80869	0.83516	0.82482	0.81192	0.79593	0.83174	0.81682	0.81597	0.80855	0.85010	0.80000	0.82713	0.84677	0.81509
vWA	0.81212	0.77888	0.81960	0.80909	0.79312	0.80398	0.81818	0.76176	0.77623	0.76734	0.81653	0.75504	0.82525	0.81111	0.76053	0.75559	0.77466
D8S1179	0.74889	0.80606	0.79919	0.81899	0.80029	0.79702	0.81333	0.74571	0.79657	0.74964	0.79566	0.79298	0.79333	0.76545	0.81357	0.81358	0.78724
TPOX	0.64646	0.54533	0.61818	0.59879	0.55638	0.63578	0.60061	0.52502	0.62928	0.61469	0.59608	0.65175	0.74727	0.57354	0.60113	0.58231	0.54501
FGA	0.86586	0.81965	0.85131	0.85778	0.86168	0.85447	0.85960	0.82207	0.85388	0.83904	0.87171	0.80899	0.84909	0.84727	0.86701	0.87170	0.85948
Среднее на локус	0.78987	0.77972	0.79428	0.79141	0.79001	0.79501	0.79432	0.77109	0.79796	0.78043	0.79069	0.78385	0.80341	0.78347	0.78737	0.79199	0.78701

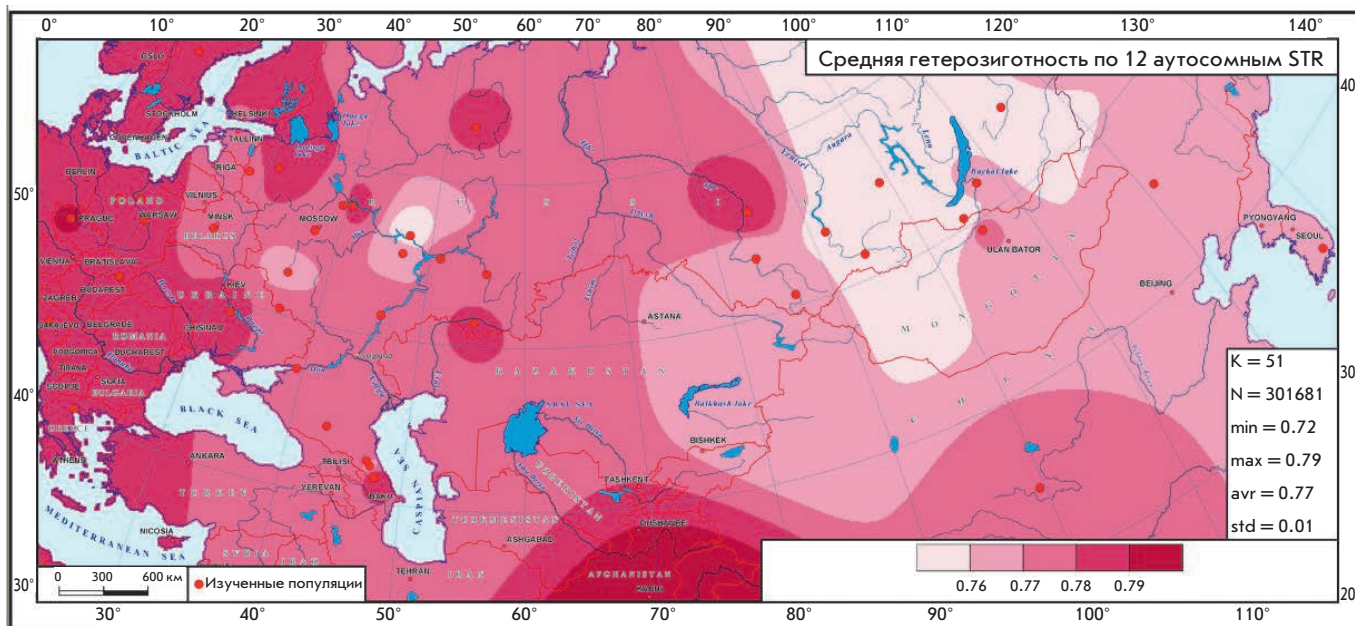


Рис. 3. Карта изменчивости уровня средней гетерозиготности 12 аутосомных микросателлитных локусов (*D3S1358, TH01, D21S11, D18S51, D13S317, D7S820, D16S539, CSF1PO, vWA, D8S1179, TPOX, FGA*). Уровень средней гетерозиготности на разных территориях показан степенью насыщенности цвета (точные значения, разграничивающие соседние оттенки, приведены в шкале карты). Изученные популяции показаны красными точками. В статистическом окне легенды приведены: число опорных точек (*K*), число узлов сетки карты (*N*), минимальное (*min*), максимальное (*max*), среднее (*avr*) значения гетерозиготности и стандартное отклонение (*std*).

и отсутствием значимой межпопуляционной дифференциации (значения F_{st} при попарных сравнениях не превышают 0.25%). В то же время группа славянских популяций значительно отличается от большинства других популяций. Популяции Волго-Уральского региона (татары и чуваша), а также марийцы не имеют значимых генетических различий между собой, но отличаются от других этнических групп. Две другие группы, характеризующиеся значимыми отличиями от всех остальных, формируют народы Северного Кавказа (даргинцы, аварцы и лезгины), а также башкиры и хакасы.

Общий уровень генетической дифференциации пула из 17 популяций оказался относительно высоким ($F_{st} = 0.0267$, или 2.67%) и высоко значимым ($p > 0.00001$).

В то же время анализ внутри массива из шести русских городских популяций, несмотря на значительную территориальную разбросанность городов, представляющих центр Европейской части России (Москва), ее юг (Белгород, Орел), север (Ярославль), Урал (Оренбург) и Сибирь (Томск), выявил полное отсутствие межпопуляционных различий по частотам и молекулярной дисперсии 15 микросателлитов в этих популяциях. Значение F_{st} в шести российских городских популяциях составило -0.00095 ($p = 0.6187$).

В контексте применения изученных 15 STR в це-

лях ДНК-идентификации эти данные указывают, во-первых, на возможность использования суммарных частот по российским мегаполисам при проведении судебно-медицинских экспертиз городского (преимущественно русского) населения, и, во-вторых, на необходимость учета данных по частотам «идентификационных» маркеров в других этнических группах Российской Федерации для расчетов в этих популяциях.

Сравнение частот 15 STR в совокупной выборке населения российских городов с частотами у белых американцев, представленными компанией «Promega» [2] в качестве референтных для набора PowerPlex 16, методом полокусного анализа молекулярной дисперсии выявило достоверные различия по частотам 12 из 15 микросателлитных локусов (табл. 3).

Генетические взаимоотношения между популяциями: филогенетический анализ

На основании матрицы попарных генетических расстояний между популяциями по совокупности 15 STR-локусов, полученной методом AMOVA, с учетом различий в частотах аллелей и дисперсии числа tandemных повторов было построено древо генетических взаимоотношений между популяциями. Дендрограмма, сконструированная методом невзвешенного попарного среднего (UPGMA) в пакете программ

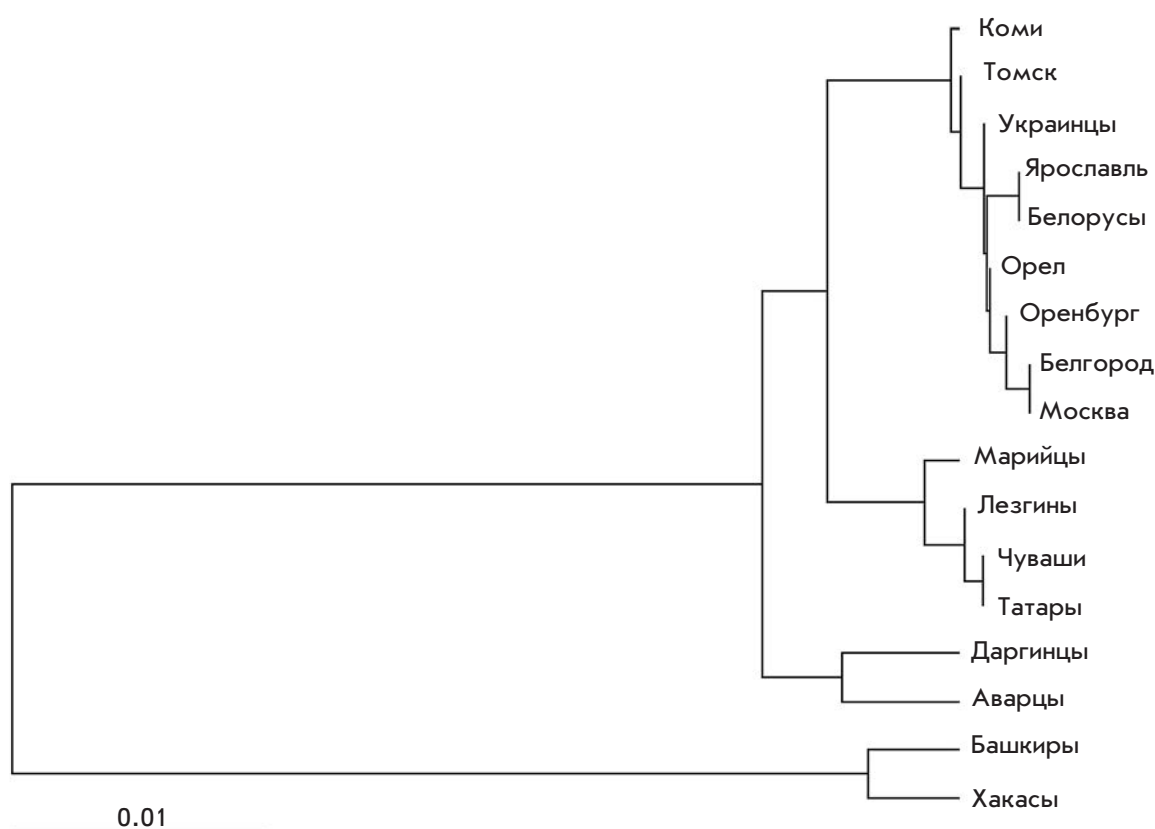


Рис. 4. Дендрограмма генетических расстояний между популяциями.

PHYLIP, приведена на рис. 4.

Расположение популяций на дендрограмме полностью соответствует выявленной картине генетической дифференциации населения России по ДНК-маркерам, используемым в судебно-медицинской экспертизе. Изученные популяции группируются в четыре кластера, каждый из которых характеризуется общностью генного пула популяций внутри кластера и значимыми отличиями (и большими генетическими расстояниями) от популяций других кластеров.

Наиболее удаленный кластер формируют популяции хакасов и башкир – две популяции с наибольшей долей монголоидного расового компонента. Все остальные популяции гораздо ближе друг к другу, чем к башкирам или хакасам, но также четко делятся на три обособленные группы – славянские популяции (все изученные российские мегаполисы, украинцы, белорусы) и коми; популяции Волго-Уральского региона (чуваш, татары, марийцы); популяции Северного Кавказа (даргинцы и аварцы). Вызывает удивление расположение популяции лезгин в кластере с тюрко- и уралоязычными популяциями Волго-Уральского региона. Вероятно, это вызвано случайными эффектами, связанными с небольшой числен-

Таблица 3. Полокусное сравнение частот 15 STR в русских городских популяциях и у белых американцев

Локус	F_{st}	p
<i>D3S1358</i>	0.00169	0.02444+/-0.00383
<i>TH01</i>	0.00238	0.00782+/-0.00343
<i>D21S11</i>	0.00113	0.04008+/-0.00603
<i>D18S51</i>	0.00380	0.00000+/-0.00000
<i>PentaE</i>	0.00181	0.00196+/-0.00136
<i>D5S818</i>	0.00091	0.13001+/-0.01025
<i>D13S317</i>	0.00638	0.00000+/-0.00000
<i>D7S820</i>	0.00436	0.00000+/-0.00000
<i>D16S539</i>	0.00132	0.05963+/-0.00636
<i>CSF1PO</i>	0.00205	0.02835+/-0.00465
<i>PentaD</i>	0.00460	0.00000+/-0.00000
<i>vWA</i>	0.00154	0.02639+/-0.00540
<i>D8S1179</i>	0.00256	0.00391+/-0.00185
<i>TPOX</i>	0.00438	0.00489+/-0.00203
<i>FGA</i>	0.00095	0.06256+/-0.00769



Рис. 5. Положение популяций в пространстве двух первых размерностей многомерного шкалирования матрицы генетических расстояний для 51 популяции Евразии (17 популяций из настоящей работы и опубликованные данные по 34 популяциям). Европейский кластер включает следующие популяции: шведы, греки, коми, чехи, словаки (две выборки), поляки (три выборки), украинцы, белорусы, русские Белгорода (две выборки), русские Орла (две выборки), русские Ярославля, русские Костромы, русские Новгорода, русские Пскова, русские Минеральных Вод, русские Ростова-на-Дону, русские Саратова, русские Оренбурга, русские Томска.

ностью выборки.

Генетические взаимоотношения между популяциями: многомерное шкалирование

Положение популяций в пространстве двух первых размерностей многомерного шкалирования представлено на рис. 5. Пространственное размещение популяций наилучшим возможным способом отражает степень сходства отдельных генофондов друг с другом. Можно видеть, что все европейские популяции сконцентрированы в левой части графика. Тесное соседство популяций в европейском кластере указывает на единство генофонда изученных популяций (шведы, греки, поляки, чехи, словаки, целый ряд восточнославянских популяций, коми). В непосредственной близости располагаются еще два кластера: народов Волго-Уральского региона и народов Северного Кавказа. Примечательно, что многомерное шкалирование, в отличие от филогенетического анализа, помещает лезгин в общий кластер с даргинцами и аварцами. В правой же половине графика разместились азиатские популяции. Здесь самый крупный и обширный (т.е. генетически разнообразный) кластер сформирован южносибирскими и централь-

ноазиатскими популяциями. Несколько особняком расположены народы крайнего северо-востока Сибири (коряки и чукчи), формирующие собственный кластер. Наконец, восточноазиатские популяции (китайцы и корейцы) тоже формируют отдельный кластер. Любопытно, что популяция русских, несколько поколений проживающих в Китае [35], генетически неотличима от коренных народов Восточной Азии.

Можно сделать вывод, что панель из 12 аутоматических микросателлитных локусов, используемых в практической деятельности судебно-медицинских экспертов, оказывается высокоинформативной и для фундаментальных исследований генофонда. Это подтверждается, во-первых, согласованностью между генетической кластеризацией популяций по набору маркеров и географической (а также лингвистической) группировкой тех же популяций. Во-вторых, само размещение популяций в пространстве графика вторит их размещению в пространстве географической карты (например, коряки и чукчи располагаются в правом верхнем углу графика и в правом верхнем углу географической карты России). В-третьих, относительные размеры кластеров хорошо согласуются с ранее сформировавшимися в науке представлениями (например, убывание гетерозиготности с запада на восток, выраженная гетерогенность сибирского кластера). Укажем, что высокая межпопуляционная изменчивость в Сибири хорошо согласуется с низкой внутривидовой изменчивостью (гетерозиготностью) этих популяций (рис. 3), поскольку обе особенности являются типичными следствиями дрейфа генов, интенсивность которого повышена в малочисленных и изолированных популяциях Сибири. Еще один важный вывод – контраст между гомогенностью европейских популяций (географически столь далекие друг от друга популяции, как шведы, греки и русские, почти неразличимы на графике) и гетерогенностью других изученных регионов. Популяции Кавказа, Волго-Уральского региона, Южной Сибири, Северо-Восточной Сибири, Восточной Азии обладают резко отличающимися частотами аллелей. Популяции Сибири, кроме этого, еще и значительно различаются между собой.

Представляется, что этот факт может иметь и большое практическое значение, поскольку становится ясным, в каких географических пределах могут быть применимы базы данных о частотах маркеров, используемых в судебно-медицинской экспертизе. Например, при расчете вероятности случайного совпадения в ходе идентификации личности можно рекомендовать применение отдельных баз данных для коренных народов Кавказа, народов Волго-Уральского региона и Сибири, причем в последнем случае может потребоваться и более дробное райони-

Таблица 4. Идентификационные параметры 15 STR в некоторых популяциях

Популяция	Вероятность совпадения генотипов (MP)	MP в пересчете 1 из ...	Исключающая способность (PE)	Индекс отцовства (PI)
Белгород	1.66×10^{-16}	6.33×10^{15}	0.999998	742717
Орел	2.53×10^{-16}	3.95×10^{15}	0.9999992	1003109
Оренбург	1.06×10^{-16}	9.36×10^{15}	0.9999991	1065170
Ярославль	2.46×10^{-16}	4.04×10^{15}	0.9999997	3378695
Томск	3.44×10^{-18}	2.81×10^{17}	0.9999990	880293
Русские суммарно	3.19×10^{-18}	3.12×10^{17}	0.9999989	834233
Белорусы	9.11×10^{-17}	1.08×10^{16}	0.999997	284297
Украинцы	6.34×10^{-18}	1.56×10^{17}	0.9999995	1834277
Коми	5.60×10^{-17}	1.73×10^{16}	0.999998	451441
Марийцы	3.28×10^{-16}	3.04×10^{15}	0.999998	46918
Хакасы	7.42×10^{-17}	1.37×10^{16}	0.999991	192783
Белые американцы		1.83×10^{17}	0.9999994	1520000

рование. Одним из важнейших источников информации для составления этих баз данных может послужить информация о частотах аллелей в популяциях России, представленная в нашей работе.

Идентификационный потенциал 15 STR в популяциях России и сопредельных стран

С целью оценки возможности использования исследованной системы маркеров для ДНК-идентификации в судебно-медицинской экспертизе определили стандартные популяционно-статистические показатели, характеризующие идентификационный потенциал системы маркеров. Эти показатели включают вероятность случайного совпадения генотипов (MP, Matching Probability), вероятность дискриминации неродственных индивидов (PD, Power of Discrimination), исключающую способность (PE, Power of Exclusion), индекс отцовства (PI, Paternity Index). Показатели MP и PD используются в ДНК-идентификации личности, а значения PE и PI рассчитываются при определении отцовства. Значения этих показателей в некоторых популяциях, а также у белых американцев приведены в *табл. 4*.

В целом, все изученные популяции имели очень высокие значения дискриминационного потенциала системы PowerPlex 16. Вероятность случайного совпадения генотипов по 15 STR-маркерам для суммарной выборки русского городского населения составила 1 из 281 000 000 000 000 000 (1 из 281 квадриллиона) индивидов. В других популяциях этот показатель чуть ниже, но все равно значительно превышает все разумные пороги для ДНК-идентификации.

Следует также отметить, что показатели информа-

тивности определения отцовства во всех популяциях на несколько порядков превышают значения, установленные нормативными актами, действующими на территории Российской Федерации. Так, в части 7 «Инструкции по организации и производству экспертных исследований в бюро судебно-медицинской экспертизы», утвержденной приказом Минздрава РФ № 161 от 24.03.2003, установлены следующие уровни доказательности экспертного исследования: Байесова вероятность отцовства не ниже 0.9990 и индекс отцовства (PI) не ниже 1000 для случаев полного трио мать-ребенок-предполагаемый отец; и Байесова вероятность не ниже 0.9975 и PI не ниже 400 для дуэта ребенок-предполагаемый отец.

Полученные нами показатели информативности 15 STR для целей ДНК-идентификации в судебно-медицинской экспертизе в популяциях русских и украинцев либо превышают, либо очень близки к значениям у белых американцев США (референтные данные компании «Promega»). В других этнических группах России эти показатели несколько ниже в силу либо меньшего объема выборок, либо особенностей их популяционно-генетической структуры, однако, в любом случае остаются чрезвычайно высокоинформативными.

База данных «ДНК-идентификация RusDNAid»

Первичные данные о частотах аллелей 15 микросателлитных локусов набора PowerPlex 16 в 17 популяциях России и сопредельных стран представлены в разработанной нами базе данных RusDNAid. База данных размещена на веб-сайтах Института медицинской генетики СО РАМН (<http://www.>

medgenetics.ru/web-resources/pp16-rus/) и Института общей генетики имени Н.И. Вавилова РАН (www.vigg.ru/info/data_bases/human/DNAid). Приведенные частоты могут быть референтными (для соответствующей популяции или этнической группы) для расчета вероятностей идентификации для генетической экспертизы, включая идентификацию личности, тестирование отцовства и др. Кроме того, данные могут использоваться в популяционно-генетических сравнительных исследованиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые для населения России и сопредельных стран получены оценки генетической вариабельности микросателлитных локусов, используемых в целях ДНК-идентификации в соответствии с международным стандартом такого рода исследований. Впервые оценена информативность и разрешающая способность полной панели STR-локусов, получены референтные частоты аллелей для городских популяций России, некоторых этнических групп Российской Федерации и ближнего зарубежья.

Идентификационные параметры систем для ДНК-идентификации личности на основе международного стандарта CODIS, включающего 13 STR-локусов или его расширенного варианта из 15 STR, составляющих набор PowerPlex 16 (референтные частоты аллелей и показатели идентификационной способности генотипирующих систем), оценены для большинства популяций стран Европы, США, Японии и ряда других государств. Эти референтные базы лежат в основе работы национальных служб судебно-медицинской экспертизы. В России референтная база данных по входящим в стандартные идентификационные панели локусам до настоящей работы

отсутствовала. Результаты представленной работы позволяют восполнить этот пробел и дают возможность привести стандарты типирования личности в судебно-медицинской экспертизе в соответствие с международной практикой.

Пространственная организация генетического разнообразия, выявленная по панели STR-маркеров, используемых для ДНК-идентификации, методами географии, филогенетического анализа и многомерного шкалирования отражает общую закономерность географической кластеризации популяций человека по различным типам генетических маркеров – от классического белкового полиморфизма до полногеномных наборов SNP (см., например, [22]); демонстрирует значительную подразделенность генофонда народов России и сопредельных стран и необходимость учета популяционно-генетической структуры при судебно-медицинских исследованиях и ДНК-идентификации личности в криминалистике. ●

Авторы благодарят компанию «Протега» за предоставленные наборы PowerPlex 16. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 07-04-01749, 09-04-00143, 10-04-01603, 10-06-00451, 11-04-01867), ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 гг.» (госконтракт № 16.512.11.2033), ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (госконтракты № П321 и 02.740.11.0284) и Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gill P, Fereday L, Morling N, Schneider P.M. // Forensic Sci. Int. 2006. V. 156. P. 242–244.
- www.promega.com
- Rowold D.J., Herrera R.J. // Forensic Sci. Int. 2005. V. 151. P. 59–69.
- Human Identification: The use of DNA markers / Ed. B. Weir. London: Kluwer Acad. Publ., 1995.
- Biesecker L.G., Bailey-Wilson J.E., Ballantyne J. // Science. 2005. V. 310. P. 1122–1123.
- Lincoln P., Carracedo A. // Forensic Sci. Int. 2000. V. 110. P. 3–5.
- Budowle B., Shea B., Niezgoda S., Chakraborty R. // J. Forensic Sci. 2001. V. 46. P. 453–489.
- Lessig R., Willuweit S., Krawczak M. // Leg. Med. (Tokyo). 2003. V. 5 Suppl 1. P. 160–163.
- Budowle B., Moretti T.R., Baumstark A.L., Defenbaugh D.A., Keys K.M. // J. Forensic Sci. 1999. V. 44. P. 1277–1286.
- Boryst S., Vanstone H., Carmody G., Fournery R. // J. Forensic Sci. 2000. V. 45. P. 945–946.
- Kuperschmid T., Calicchio T., Budowle B. // J. Forensic Sci. 1999. V. 44. P. 392–395.
- Gehrig C., Hochmeister M., Borer U.V., Dirnhofer R., Budowle B. // J. Forensic Sci. 1999. V. 44. P. 1035–1038.
- Boryst S., Iwamoto R., Miyakoshi J., Carmody G., Fournery R. // J. Forensic Sci. 1999. V. 44. P. 1319.
- Bhoopat T., Leaungsiyakul T., Steger H.F. // Leg. Med. (Tokyo). 2006. V. 8. P. 198–200.
- Zhivotovsky L.A., Akhmetova V.L., Fedorova S.A., Zhirkova V.V., Khusnutdinova E.K. // Forensic Sci. Int. Genet. 2009. V. 3. P. E111–116.
- Малярчук Б.А., Wozniak M., Czarny J., Деренко М.В., Grzybowski T., Miscicka-Sliwka D. // Молекуляр. биология. 2007. Т. 41. № 1. С. 3–7.
- Шорохова Д.А., Степанов В.А., Удовенко Ю.Д., Новоселов В.П., Пузырёв В.П. // Молекуляр. биология. 2005. Т. 39. № 6. С. 965–970.
- Stepanov V.A., Melnikov A.V., Lash-Zavada A.Y., Kharkov V.N., Borinskaya S.A., Tyazhelova T.V., Zhukova O.V., Schneider Y.V., Shil'nikova I.N., Puzyrev V.P., Rybakova A.A., Yanovsky N.K. // Leg. Med. 2010. V. 12. № 5. P. 256–258.

19. Степанов В.А. Этногеномика населения Северной Евразии. Томск: Печатная Мануфактура, 2002. 244 с.
20. Балановская Е.В., Балановский О.П. Русский генофонд на русской равнине. М.: Луч, 2007. 416 с.
21. Хуснутдинова Э.К. Молекулярная генетика народов Волго-Уральского региона. Уфа: Гилем, 1999. 238 с.
22. Степанов В.А. // *Acta Naturae*. 2010. Т. 2. № 4(7). С. 18–34.
23. Guo S., Thompson E. // *Biometrics*. 1992. V. 48. P. 361–372.
24. Excoffier L., Laval G., Schneider S. // *Evolutionary Bioinformatics Online*. 2005. V. 1. P. 47–50.
25. Konjhodžić R., Kubat M., Škavić J. // *Int. J. Leg. Med.* 2004. V. 118. P. 119–121.
26. Jakovski Z., Nikolova K., Furac I., Masic M., Janeska B., Kubat M. // *Int. J. Leg. Med.* 2006. V. 120. P. 53–55.
27. Liao G., Liu T., Ying B., Sun L., Zou Y., Wang Z., Fan H., Wen F. // *J. Forensic Sci.* 2008. V. 53. № 1. P. 252–253.
28. Jacewicz R., Jedrzejczyk M., Ludwikowska M., Berent J. // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2008. V. 2. № 1. P. 1–3.
29. Kovatsi L., Parsons T.J., Just R.S., Irwin J.A. // *Forensic Sci. Int.* 2006. V. 159. P. 61–63.
30. Montelius K., Karlsson A.O., Holmlund G. // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2008. V. 2. № 3. P. 49–52.
31. Piatek J., Jacewicz R., Ossowski A., Parafiniuk M., Berent J. // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2008. V. 2. № 3. P. 41–43.
32. Rebała K., Wysocka J., Kapińska E., Cybulska L., Mikulich A.I., Tsybovsky I.S., Szczerkowska Z. // *Forensic Sci. Int.* 2007. V. 173. № 2–3. P. 235–237.
33. Soták M., Petrejčíková E., Bernasovská J., Bernasovský I., Sovicová A., Boronová I., Svicková P., Bôžiková A., Gabriková D. // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2008. V. 3. № 1. P. 21–25.
34. Szczerkowska Z., Kapińska E., Wysocka J., Cybulska L. // *Forensic Sci. Int.* 2004. V. 11. № 144(1). P. 69–71.
35. Zhu B.F., Yang G., Shen C.M., Qin H.X., Fan S.L., Deng L.B., Chen F., Chen L.P., Wang H.D., Wang Z.Y., Lucas R., Lian Z.M. // *Mol. Biol. Rep.* 2010. V. 37. P. 3889–3895.
36. Zhivotovsky L.A., Malyarchuk B.A., Derenko M.V., Wozniak M., Grzybowski T. // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2009. V. 3. № 4. P. 111–116.
37. Simková H., Faltus V., Marvan R., Pexa T., Stenzl V., Broucek J., Horínek A., Mazura I., Zvárová J. // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2009. V. 4. № 1. P. 15–17.
38. Soták M., Petrejčíková E., Bôžiková A., Bernasovská J., Bernasovský I., Sovicová A., Boronová I., Svicková P., Gabriková D., Mačková S., Carnogurská J., Rebała K., Vlček D. // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2010. V. 5. P. e53–62.
39. Rakha A., Yu B., Hadi S., Sheng-Bin L. // *Leg. Med.* 2009. V. 11. № 6. P. 305–307.
40. Nei M. *Molecular Population Genetics and Evolution*. Amsterdam: North-Holland Publ. Co., 1975. 290 p.
41. StatSoft, Inc. 2001. STATISTICA (data analysis software system), version 6. www.statsoft.com.
42. Powerstats Version 1.2, Promega Corporation.
43. Рычков Ю.Г., Балановская Е.В. // *Генетика*. 1992. Т. 28. С. 52–75.

УДК 577.18.02

N-Концевой участок антимикробного пептида Ltc1-K усиливает его токсичность для клеток эукариот

О. В. Самсонова^{1,2}, К. С. Кудряшова¹, А. В. Феофанов^{1,2*}¹Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119992, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12²Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

*E-mail: avfeofanov@yandex.ru

Поступила в редакцию 11.02.2011 г.

РЕФЕРАТ Исходя из гипотезы и ряда экспериментальных данных о том, что гемолитическая активность линейных катионных антимикробных пептидов зависит от их гидрофобного N-концевого участка, определили свойства антимикробного пептида Ltc1-K и его производных без одного, двух или трех N-концевых аминокислотных остатков. Обнаружено, что удаление трех аминокислотных остатков приводит к значительному снижению токсичности пептида для клеток эукариот и к повышению за счет этого избирательности его действия в отношении некоторых видов бактерий. Исследования, проведенные на искусственных мембранах и эритроцитах человека, позволяют сделать вывод, что основной причиной наблюдаемого эффекта является многократное уменьшение аффинности пептида к плазматической мембране клеток эукариот, обогащенной цвиттер-ионными фосфолипидами.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА антибактериальные пептиды, латарцины, гемолитическая активность, круговой дихроизм, оптическая микроскопия.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АМП – антимикробные пептиды; ЛСКМ – лазерная сканирующая конфокальная микроскопия; КД – круговой дихроизм; ЯМР – ядерный магнитный резонанс; БМЛ – большие моноламеллярные липосомы; ДОФХ – 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин; ЛМФХ – 1-миристоил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолин; КФ – карбоксифлуоресцеин; ФД70 и ФД500 – меченные флуоресцеином декстраны с молекулярным весом 70 и 500 кДа; ГК₅₀ – концентрация пептида, вызывающая 50% вытекание гемоглобина из эритроцитов; ЭК₅₀ – концентрация пептида, вызывающая гибель 50% клеток; МИК – минимальная ингибирующая концентрация; K_d – константа диссоциации.

ВВЕДЕНИЕ

Антимикробные пептиды (АМП) – это природные соединения, разнообразные по структуре и биологическим функциям, объединенные способностью угнетать жизнедеятельность патогенных микроорганизмов. Считается, что эндогенные АМП являются одним из ключевых и, вместе с тем, эволюционно древних факторов врожденного иммунитета многоклеточных, что позволяет рассматривать их в качестве прототипов антибиотиков нового поколения [1–3]. Поиск новых и детальное изучение уже известных АМП стимулируется развитием у микроорганизмов устойчивости к классическим антибиотикам и способностью многих АМП преодолевать эту устойчивость.

Недавно из яда среднеазиатского паука *Lachesana tarabaevi* была выделена и охарактеризована новая

группа АМП, состоящая из семи коротких катионных линейных пептидов – латарцинов [4]. Латарцины Ltc1, Ltc2a и Ltc5, как и многие другие АМП, обладают не только высокой антибактериальной активностью, но и умеренной гемолитической активностью [4]. АМП рассматривают как альтернативу существующим антибиотикам, поэтому наличие у них цитотоксичности в отношении клеток человека нежелательно. Как с исследовательской, так и с практической точки зрения важно выявить структурные детерминанты, ответственные за цитотоксичность АМП. У линейных α -спиральных АМП нами был идентифицирован один из таких структурных элементов [5]. На основе структурно-функционального анализа большого числа α -спиральных АМП установлено, что гидрофобный N-концевой участок усиливает гемолитическую активность этих пептидов. На примере латарцинов

Таблица 1. Аминокислотные последовательности Ltc1-K и его производных

Пептид	Аминокислотная последовательность
Ltc1-K	SMWSGMWRRKLLKLRNALKKKCLKGEEK
(-1)Ltc1-K	MWSGMWRRKLLKLRNALKKKCLKGEEK
(-2)Ltc1-K	WSGMWRRKLLKLRNALKKKCLKGEEK
(-3)Ltc1-K	SGMWRRKLLKLRNALKKKCLKGEEK

Ltc2a и Ltc5 доказано, что снизить активность АМП в отношении клеток эукариот можно, если удалить у них N-концевой участок или ввести в него точечные аминокислотные замены, снижающие гидрофобный потенциал [5].

Развивая это направление, мы представляем результаты изучения свойств АМП Ltc1-K (табл. 1), который соответствует непротессированной форме латарцина Ltc1 с дополнительным остатком лизина на C-конце. По гемолитической активности и бактерицидному действию в отношении *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis* Ltc1-K не отличается от зрелого Ltc1 [6]. Методом ЯМР показано, что при связывании Ltc1-K с мицеллами додецилсульфата натрия (простейшая модель, имитирующая мембрану) N-концевой участок α -спирального пептида погружается в гидрофобную область мицеллы [7]. С учетом данных ЯМР [7] и структурно-функционального анализа [5] мы предположили, что N-концевой фрагмент усиливает связывание Ltc1-K с мембранами, состоящими из цвиттер-ионных липидов, и определяет цитотоксическую активность пептида. Для проверки этой гипотезы были синтезированы три аналога Ltc1-K, укороченных с N-конца на один, два и три аминокислотных остатка (табл. 1), и проведен сравнительный анализ их структуры, активности и особенностей гемолитического действия.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы

В работе использованы следующие реактивы: 1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ДОФХ) и 1-миристоил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ЛМФХ) фирмы «Avanti Polar Lipids» (США); питательная среда Мюллера-Хинтона, карбоксифлуоресцеин (КФ), меченные флуоресцеином декстраны с молекулярным весом 70 и 500 кДа (ФД70 и ФД500), флуоресцентные красители FM1-43, йодистый пропиций и Hoechst 33342 («Sigma-Aldrich», США); культуральная среда Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640) компании «ПанЭко» (Россия); гепарин («Синтез», Россия). Остальные реагенты были категории «ос. ч.».

Пептиды (табл. 1) синтезированы методом твердофазного синтеза в лаборатории химии пептидов Института биоорганической химии РАН (Москва) (рук. группы Н.С. Егорова) и охарактеризованы методами ВЭЖХ и масс-спектрометрии (MALDI-MS) как описано ранее [4, 6]. Концентрации пептидов в водных растворах определяли по УФ-поглощению с использованием спектрофотометра СФ-256 («ЛОМО», Россия) на основе молярных коэффициентов экстинкции $5500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для (-3)Ltc1-K и $11000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для Ltc1-K, (-1)Ltc1-K и (-2)Ltc1-K при длине волны 280 нм.

Измерение и анализ спектров кругового дихроизма (КД)

Спектры КД пептидов измеряли в фосфатно-солевом буфере (110 mM NaCl, 50 mM NaH_2PO_4 , pH 7.4) и в ЛМФХ-мицеллах (30 mM по липиду) в фосфатно-солевом буфере при концентрации пептида 40 мкМ, используя спектрополяриметр Jasco J-810 («Jasco», Япония). Образцы, содержащие ЛМФХ, предварительно инкубировали в течение 30 мин при 25°C для установления равновесного распределения пептида между мицеллами. Спектры регистрировали в диапазоне 190–250 нм с шагом 0.2 нм (спектральная ширина щели 1 нм). Образец помещали в разборную кварцевую кювету («Hellma», Германия) с длиной оптического пути 0.01 см. Вторичные структуры пептидов рассчитывали по спектрам КД с помощью программы CONTILL [8]. Результаты расчета усредняли по двум независимым экспериментам.

Приготовление суспензии эритроцитов

Капиллярную кровь донора (100–150 мкл) смешивали со средой RPMI-1640, содержащей гепарин (10 ед./мл). Клетки осаждали центрифугированием в течение 2 мин при 300 g, а осадок ресуспендировали в среде без гепарина до конечной концентрации эритроцитов 2×10^7 кл/мл. Все опыты проводили в течение 2–3 ч после забора крови.

Анализ гемолитической активности

Для определения гемолитической активности пептидов суспензию эритроцитов смешивали в равном объемном соотношении с пептидом, предварительно разведенным RPMI-1640 до нужной концентрации, и инкубировали в течение 1 ч (37°C) при постоянном перемешивании (140 об/мин). При этом в среду добавляли или не добавляли 8% эмбриональной телячьей сыворотки. Затем клетки осаждали центрифугированием (1200 g, 5 мин) и отбирали супернатант. Выход гемоглобина из эритроцитов оценивали по оптической плотности супернатанта при длине волны 414 нм, измеренной в планшетном фотометре

ПИКОН (Россия). Степень гемолиза рассчитывали по формуле:

$$ГК_{\%} = (ОП_s - ОП_0) / (ОП_{100} - ОП_0) \times 100\%, \quad (1)$$

где ОП_s, ОП₀, ОП₁₀₀ – оптические плотности (414 нм) супернатантов, полученных соответственно от исследуемого образца, контрольных и полностью лизированных клеток. Для полного лизиса эритроцитов среду RPMI-1640 заменяли деионизированной водой. Усредняли результаты двух независимых экспериментов, в каждом из которых измерения выполняли в трех повторах. К контрольным клеткам добавляли эквивалентное количество среды без пептида. Концентрационную зависимость гемолиза аппроксимировали уравнением сигмоидальной зависимости и определяли концентрацию пептида, вызывающую 50% вытекание гемоглобина из эритроцитов (ГК₅₀).

Анализ цитотоксичности

Клетки эритромиелоидного лейкоза человека K562 культивировали (5% CO₂, 37°C) в среде RPMI-1640 с 8% эмбриональной телячьей сывороткой и L-глутамином (2 мМ). Цитотоксичность пептидов определяли как описано ранее [9]. Клетки инкубировали в течение 3 ч (5% CO₂, 37°C) в среде, содержащей исследуемые пептиды в серийных разведениях (от 0.1 до 100 мкМ). Затем в среду вносили йодистый пропиций (10 мкМ), Hoechst 33342 (10 мкМ), через 10 мин анализировали состояние клеток при помощи флуоресцентного микроскопа Axiovert 200M («Carl Zeiss», Германия). Клетки, окрашенные только Hoechst 33342, считали живыми, а окрашенные Hoechst 33342 и йодистым пропицием – погибшими. При каждой концентрации пептидов анализировали не менее 500–1000 клеток. Усредняли результаты двух независимых экспериментов. К контрольным клеткам добавляли эквивалентное количество среды без пептида. Концентрационную зависимость цитотоксичности аппроксимировали сигмоидальной кривой и определяли концентрацию пептидов, вызывающую гибель 50% клеток (ЭК₅₀).

Анализ антибактериальной активности

Клетки *E. coli* C600, *Micrococcus luteus* Ac-2230 VKM и *B. subtilis* B-501 VKM культивировали в среде Мюллера–Хинтона (37°C). Антибактериальную активность пептидов определяли методом серийных разведений в жидкой среде как детально описано ранее [9]. Суспензию бактерий (10⁵ кл./мл) инкубировали в среде Мюллера–Хинтона в присутствии серийных разведений пептидов в течение 24 ч при 37°C. Критерием активности пептида служило отсутствие размножения бактерий, которое регистрировали,

сравнивая оптическую плотность (595 нм) культуры бактерий в присутствии пептида и в контроле, при помощи планшетного спектрофотометра («Пикон», Россия). Усредняли результаты двух независимых экспериментов, в каждом из которых измерения выполняли в трех повторах. К контрольным клеткам добавляли эквивалентное количество среды без пептида. Активность характеризовали величиной минимальной ингибирующей концентрации (МИК).

Приготовление больших моноламеллярных липосом (БМЛ)

Навеску ДОФХ гидратировали в фосфатно-солевом буфере (110 мМ NaCl, 50 мМ NaH₂PO₄, рН 7.4) в течение 2 ч при 25°C и интенсивном встряхивании. Суспензию мультиламеллярных липосом с ДОФХ в концентрации 10 мМ получали методом замораживания–оттаивания в жидком азоте (10 циклов). БМЛ диаметром 100 нм готовили путем экструзии суспензии мультиламеллярных липосом через поликарбонатный фильтр с диаметром пор 100 нм («Whatman», Великобритания) в соответствии с рекомендациями производителя мини-экстурдера («Avanti Polar Lipids», США).

Изучение взаимодействия пептидов с ДОФХ-липосомами

Связывание с липидным бислоем оценивали по коротковолновому сдвигу спектра флуоресценции остатков Trp в составе пептидов при переходе боковой цепи Trp из полярного окружения в гидрофобное. Спектры флуоресценции измеряли на спектрофлуориметре LS 55 («Perkin Elmer», Великобритания) при 25°C. Флуоресценцию возбуждали при 270 нм, а спектр испускания регистрировали в диапазоне от 300 до 500 нм с шагом измерения 0.5 нм. Чтобы снизить искажения спектров из-за рассеяния света на липосомах, использовали кварцевую кювету сечением 10 × 2 мм, регистрируя флуоресценцию от тонкого слоя образца (2 мм).

Образцы содержали 2 мкМ пептида и от 0.1 до 5 мМ ДОФХ в форме БМЛ в фосфатно-солевом буфере. Измеренные спектры анализировали в программе LabSpec2.0 («Dilor», Франция). Для расчета соотношения связанной и свободной форм пептида использовали математическую процедуру представления экспериментального спектра в виде суммы двух спектров (пептид в водном окружении и пептид, полностью связанный с липидами) с соответствующими весовыми коэффициентами. Для измерения спектра пептида, полностью связанного с липидами, использовали суспензию цвиттер-ионных ЛМФХ-мицелл (20 мМ липида). Полное связывание пептидов с ЛМФХ-мицеллами подтверждено методом КД

по зависимости формирования α -спиральной конформации пептидов от концентрации мицелл.

Константу диссоциации (K_d) определяли, как описано ранее [10], на основе усредненных по двум независимым опытам данных по формуле:

$$C_m/L = 1/K_d \times C_{\text{буф}}, \quad (2)$$

где $C_{\text{буф}}$ – концентрация свободного пептида в растворе, C_m/L – концентрация мембраносвязанного пептида, нормированная на концентрацию липида.

Отметим, что при концентрации ДОФХ больше 1 мМ из-за светорассеяния снижается интенсивность регистрируемой флуоресценции, что приводит к занижению определяемых значений C_m и $C_{\text{буф}}$. Однако это не влияет на расчетное соотношение $C_m/C_{\text{буф}}$, которое используется для определения K_d .

Микроскопические исследования

При изучении индуцированных пептидами морфологических изменений эритроцитов в среде RPMI-1640 смешивали равные объемы суспензии эритроцитов (6×10^6 кл./мл) и растворов пептидов, обеспечивая эквивалентные концентрации Ltc1-K и (-3)Ltc1-K (конечная концентрация в пробе – 4 мкМ Ltc1-K или 30 мкМ (-3)Ltc1-K), а также добавляли КФ (20 мкМ). Образец помещали в 12-луночную камеру flexiPERM («Perbio», Бельгия) со стеклянным дном толщиной 0.17 мм, центрифугировали в течение 1 мин при 250 об/мин, осаждая клетки на стекло, и переносили под микроскоп для анализа.

Для получения теней эритроциты в концентрации 10^7 кл./мл инкубировали в присутствии эквивалентных концентраций Ltc1-K (2 мкМ) или (-3)Ltc1-K (15 мкМ) в среде RPMI-1640 в течение 20 мин при 37°C. Затем к клеткам добавляли маркеры проницаемости мембраны (КФ, ФД70 или ФД500) в концентрации 20 мкМ и FM1-43 (0.9 мкМ), окрашивающий плазматическую мембрану. Образцы продолжали инкубировать в течение еще 1 ч при 37°C, а затем анализировали микроскопически.

Использовали лазерный сканирующий конфокальный микроскоп LSM 510 Meta («Carl Zeiss», Германия) с объективом C-Apochromat 63x/1.2 W. Измерения выполняли с разрешением 0.3 мкм в фокальной плоскости и 0.6 мкм вдоль оптической оси объектива. Флуорофоры возбуждали Ar⁺-лазером с длинами волн 458 нм (FM1-43) и 488 нм (КФ, ФД70, ФД500). Флуоресценцию регистрировали, выделяя нужный спектральный диапазон с помощью полосового фильтра 505–550 нм (КФ, ФД70, ФД500) и длинноволнового барьерного фильтра с границей 585 нм (FM1-43). Одновременно с флуоресцентными изображениями регистрировали изображения клеток в проходящем свете.

При изучении процессов в динамике проводили 100 повторных измерений с интервалом 2 с.

Изображения обрабатывали с использованием программы ImageJ (National Institute of Health, США). Степень затекания (A) маркеров проницаемости мембраны (КФ, ФД70, ФД500) внутрь эритроцита (%) рассчитывали по формуле:

$$A = (F_b - F_0)/(F_{\text{вне}} - F_0) \times 100, \quad (3)$$

где F_b – средняя интенсивность флуоресценции внутри тени, $F_{\text{вне}}$ – средняя интенсивность флуоресценции среды вокруг клеток, F_0 – фоновый сигнал внутри интактных эритроцитов. Степень затекания усредняли по 100–150 клеткам.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Биологические активности пептидов

Для оценки влияния N-концевого участка на гемолитическую, цитотоксическую и антибактериальную активности сравнивали способность латарцина Ltc1-K и его производных (табл. 1) лизировать эритроциты и клетки эритромиелоидного лейкоза человека, а также ингибировать рост бактерий *in vitro* (табл. 2).

Удаление от одного до трех N-концевых аминокислотных остатков не повлияло на способность пептидов подавлять рост грамположительных бактерий *B. subtilis*. Активность в отношении грамотрицательных *E. coli* и грамположительных *M. luteus* значительно снизилась лишь в случае (-3)Ltc1-K. Не обнаружено связи между изменением спектра активности Ltc1-K при удалении N-концевого участка и морфологическими или тинкториальными свойствами бактерий: активность снизилась не только в отношении грамотрицательных бацилл *E. coli*, но и грамположительных кокков *M. luteus*, у которых нет липополисахаридной оболочки. В то же время чувствительность грамположительных бацилл *B. subtilis* остается на прежнем уровне. Можно предположить, что наблюдаемое снижение активности связано в значительной степени с особенностями взаимодействия пептидов с плазматической мембраной конкретных видов бактерий.

Наиболее вероятным механизмом антибактериального действия Ltc1-K и его аналога, как и других катионных линейных АМП, считается пептидопосредованная пермеабиллизация мембраны бактерий. Косвенно в пользу этого свидетельствуют данные о способности исследуемых пептидов формировать дефекты в мембране эритроцитов. Пермеабиллизация мембраны бактерий может происходить путем образования тороидальных липид-

Таблица 2. Характеристики взаимодействия Ltc1-K и его производных с эритроцитами, клетками K562, бактериями и ДОФХ-липосомами

Пептид	Клетки эукариот		Бактерии			ДОФХ-липосомы
	Эритроциты ГК ₅₀ , мкМ	K562 ЭК ₅₀ , мкМ	<i>E. coli</i> МИК, мкМ	<i>B. subtilis</i> МИК, мкМ	<i>M. luteus</i> МИК, мкМ	K _д , мМ
Ltc1-K	1.1 ± 0.1	7.1 ± 0.4	1.3 ± 0.3	0.7 ± 0.2	1.1 ± 0.3	1.4 ± 0.5
(-1)Ltc1-K	0.8 ± 0.1	4.9 ± 0.2	2.6 ± 0.6	0.7 ± 0.2	2.7 ± 0.6	1.4 ± 0.7
(-2)Ltc1-K	1.3 ± 0.1	11 ± 1	2.6 ± 0.6	0.7 ± 0.2	2.9 ± 0.6	1.7 ± 0.6
(-3)Ltc1-K	8.0 ± 2.0	39 ± 5	6.5 ± 1.6	0.7 ± 0.2	5.6 ± 0.9	15 ± 3

Примечание. GK₅₀ – концентрация пептида, приводящая к гемолизу 50% эритроцитов. ЭК₅₀ – концентрация пептида, приводящая к гибели 50% клеток. МИК – минимальная концентрация, ингибирующая рост микроорганизма в жидкой питательной среде. K_д – константа диссоциации комплексов пептида с ДОФХ-липосомами.

пептидных пор или по так называемому «ковровому» механизму, вызывающему детергентоподобное повреждение мембраны [11]. В первом случае удаление гидрофобного N-концевого участка, скорее всего, будет снижать способность пептида встраиваться в гидрофобную область мембраны и инициировать формирование липид-пептидных пор. Во втором случае удаление N-концевого участка в меньшей степени будет влиять на эффективность повреждения мембраны. В обоих случаях исходное связывание пептида на мембране определяется электростатическими взаимодействиями катионных аминокислотных остатков и анионных липидов, которыми обогащена мембрана бактерий. При этом удаление N-концевого участка Ltc1-K не затрагивает электростатические взаимодействия.

Конкретные механизмы формирования дефектов в мембране разных видов бактерий могут зависеть от состава и жесткости мембраны. Соответственно меньшая, чем у Ltc1-K, активность (-3)Ltc1-K в отношении *E. coli* и *M. luteus* может указывать на пермебилизацию мембраны этих бактерий по механизму образования тороидальных липид-пептидных пор, а в случае *B. subtilis* следует предположить детергентоподобное повреждение мембраны. Экспериментальная проверка этой гипотезы требует отдельных длительных исследований и выходит за рамки данной статьи.

В опытах на эритроцитах не обнаружено существенных различий в гемолитической активности Ltc1-K, (-1)Ltc1-K и (-2)Ltc1-K, в то время как активность (-3)Ltc1-K уменьшилась в 7 раз (табл. 2). Похожая закономерность выявлена при анализе цитотоксичности пептидов в отношении клеток K562 (табл. 2). Отметим, что для удобства гемолиз эритроцитов пептидами сравнивали в среде без сыворотки,

присутствие которой (как и плазмы крови) защищает эритроциты и снижает гемолитическую активность пептидов до умеренных значений. Так, в присутствии 8% эмбриональной телячьей сыворотки величины GK₅₀ для Ltc1-K, (-1)Ltc1-K и (-2)Ltc1-K составляют соответственно 28, 67 и 58 мкМ, а для (-3)Ltc1-K измерить GK₅₀ в доступном диапазоне концентраций не удается (рис. 1).

Для сравнения можно сказать, что GK₅₀ меллитина из яда *Apis mellifera*, относящегося к высокоактивным гемолитикам, в присутствии 8% сыворотки составляет 0.3 мкМ (данные не приведены), а GK₅₀ ранее

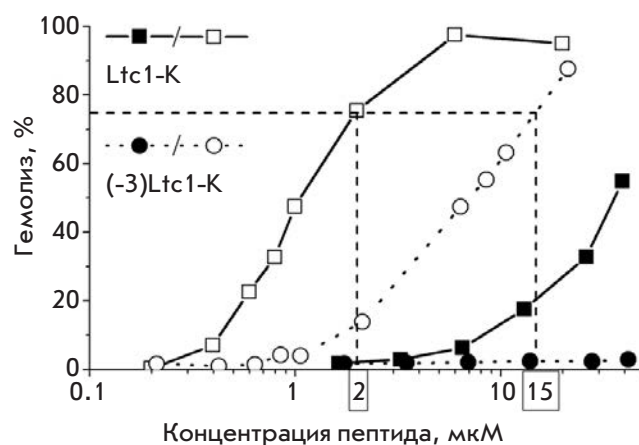


Рис. 1. Концентрационная зависимость гемолитического эффекта Ltc1-K (квадраты) и его производного (-3)Ltc1-K (кружки) в бессыывороточной среде (светлые символы) и в среде, содержащей 8% эмбриональной сыворотки теляенка (темные символы). Пунктирные линии иллюстрируют определение эквивалентных концентраций Ltc1-K и (-3)Ltc1-K, использованных в некоторых опытах.

исследованных латарцинов Ltc2a и Ltc5 равны 6 и 12 мкМ соответственно [5]. Цитотоксичность ($ЭК_{50}$) Ltc2a и Ltc5 для клеток K562 составляет 3 и 12 мкМ [5]. Гемолитическая активность у Ltc1-K заметно менее выражена, чем у Ltc2a, Ltc5 и меллитина, но сравнима с активностью других латарцинов в отношении клеток K562. Удаление N-концевого фрагмента сопровождается многократным уменьшением цитотоксичности и гемолитической активности как у Ltc2a и Ltc5 [5], так и у Ltc1-K. Таким образом, полученные данные (табл. 2) подтверждают ранее сделанные выводы [5] о том, что гемолитическая и цитотоксическая активности α -спиральных АМП усиливается за счет гидрофобного потенциала N-концевого участка. В случае Ltc1-K существенное снижение мембранолитической активности достигается после удаления N-концевого гидрофобного остатка Trp3.

Чтобы выявить причины снижения токсичности, мы изучили особенности взаимодействия Ltc1-K и его производных с эритроцитами, а также с липидными системами (ДОФХ-липосомы, мицеллы ЛМФХ), моделирующими мембрану клеток эукариот.

Сравнительный анализ аффинности пептидов к ДОФХ-липосомам

Предположив, что токсичность в отношении клеток эукариот зависит от сродства пептида к цвиттер-ионным липидам, доминирующим в составе плазматической мембраны, мы измерили константы диссоциации (K_d) комплексов Ltc1-K и его производных с ДОФХ-липосомами.

Результаты анализа связывания пептидов с липосомами представлены на рис. 2. Видно, что выбранная математическая модель хорошо описывает полученные изотермы связывания. Определенные по изотермам величины K_d для пептидов Ltc1-K, (-1)Ltc1-K и (-2)Ltc1-K одинаковы, а для (-3)Ltc1-K величина K_d возрастает в 10 раз (табл. 2), указывая на существенное снижение аффинности (-3)Ltc1-K к липидному бислою.

Оценка термодинамического вклада ΔG^0_{N-term} N-концевого участка пептида в связывание с мембраной, проведенная по формуле

$$\Delta G^0_{N-term} \sim RT \ln (K_{d(Ltc1-K)} / K_{d((-3)Ltc1-K)}), \quad (4)$$

показывает, что свободные энергии взаимодействия с бислоем у Ltc1-K и (-3)Ltc1-K отличаются на 1.4 ккал/моль, т.е. изменение свободной энергии взаимодействия составляет ~20%. Основной вклад в свободную энергию взаимодействия N-концевого участка с липидами дает остаток Trp3, и это взаимодействие, по-видимому, имеет преимущественно гидрофобную природу. В пользу этой гипотезы

свидетельствует близость значения ΔG^0_{N-term} , к величине -1.95 ккал/моль, предсказанной методом Уайта-Уимли, основанном на эмпирической шкале гидрофобности аминокислотных остатков [12].

Таким образом, удаление N-концевого участка Ltc1-K приводит к резкому снижению как гемолитической активности и цитотоксичности, так и величины K_d , подтверждая, что аффинность пептида к цвиттер-ионной мембране действительно имеет большое значение для развития гемолиза и цитотоксического эффекта.

Влияние N-концевого участка Ltc1-K на вторичную структуру пептида в комплексе с липидами

Еще один фактор, который может влиять на активность пептидов, – их конформация. Мы сравнили вторичную структуру Ltc1-K и его производных, проанализировав спектры КД пептидов в фосфатно-солевом буфере и в липидной системе – мицеллах цвиттер-ионного ЛМФХ, которую применяют для моделирования поверхности мембраны клеток эукариот [13]. ЛМФХ формирует объемную гидрофобную фазу, по диаметру сравнимую с толщиной гидрофобной области биологической мембраны [14]. Кроме того, ЛМФХ не имеет собственного спектра в области КД полипептидов и характеризуется низким уровнем светорассеяния при высокой концентрации фосфолипидного компонента, что дает возможность создать большой избыток липида над пептидом и обеспечить полное связывание пептида с мицеллами.

Обнаружено, что все исследуемые пептиды в буфере имеют преимущественно неупорядоченную

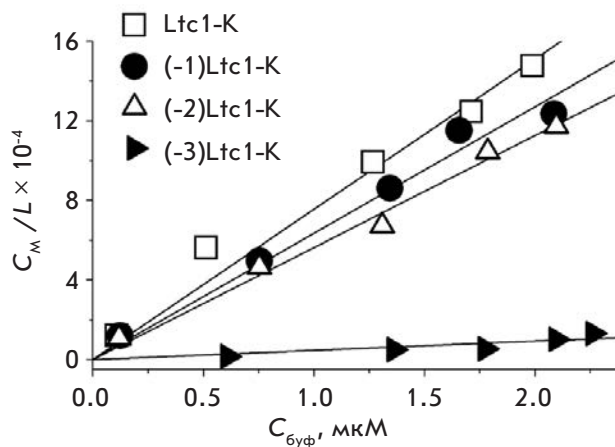


Рис. 2. Изотермы связывания Ltc1-K, (-1)Ltc1-K, (-2)Ltc1-K и (-3)Ltc1-K с ДОФХ-липосомами. Сплошными линиями показана аппроксимация экспериментальных данных линейной зависимостью по формуле (2), проведенная методом наименьших квадратов.

Таблица 3. Вклад α -спиральной конформации в структуру Ltc1-K и его производных по данным спектроскопии КД

Пептид	Фосфатно-солевой буфер		Мицеллы ЛМФХ	
	%*	а.о.**	%*	а.о.**
Ltc1-K	17	4	59	15
(-1)Ltc1-K	14	4	67	17
(-2)Ltc1-K	15	4	72	17
(-3)Ltc1-K	16	4	65	15

*Процент α -спирали в структуре молекулы.

**Число аминокислотных остатков, вовлеченных в формирование α -спирали.

структуру (рис. 3) с одинаково низким содержанием элементов α -спиральной конформации (табл. 3). При связывании с цвиттер-ионными мицеллами пептиды претерпевают существенные конформационные изменения (рис. 3): преобладающим структурным элементом становится α -спираль, в образование которой вовлечено 15–17 аминокислотных остатков (табл. 3). Полученные результаты согласуются с данными о высоком потенциале спиралеобразования Ltc1-K в 50% трифторэтаноле [6] и соответствуют общим представлениям о типичных структурных изменениях, которые сопровождают взаимодействие линейных катионных АМП с липидным бислоем. Многие АМП имеют неупорядоченную структуру в воде и формируют амфипатическую α -спираль при связывании с липидами (см. обзоры [14–16]).

Таким образом, характерное для Ltc1-K формирование α -спирали в комплексе с липидами, а так-

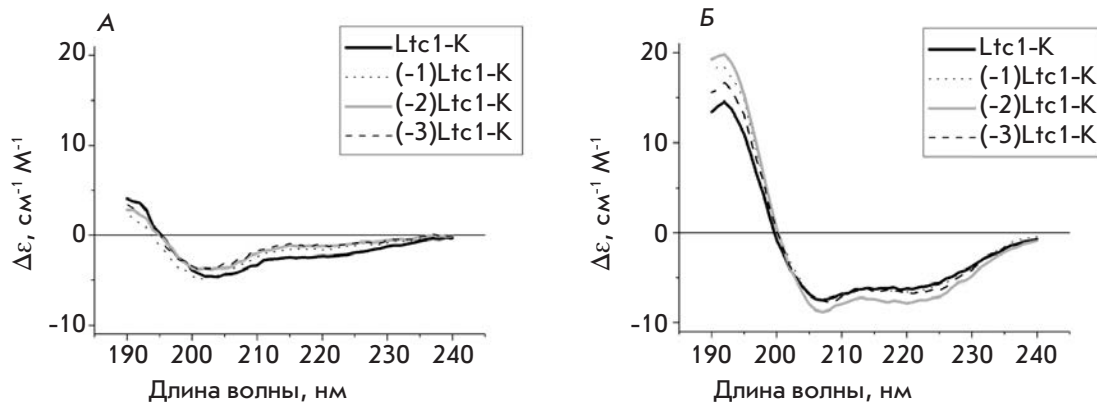
же ее размер сохраняются при удалении от одного до трех N-концевых аминокислотных остатков. По-видимому, N-концевой фрагмент Ltc1-K входит в состав участка с неупорядоченной структурой и за счет конформационной подвижности обеспечивает выигрыш в свободной энергии при связывании пептида с цвиттер-ионными липидами. Это предположение косвенно подтверждается структурой Ltc1-K в комплексе с отрицательно заряженными мицеллами додецилсульфата натрия, установленной методом ЯМР [7]. Полученные данные позволяют исключить конформационную перестройку из списка возможных причин более низкой, чем у Ltc1-K, цитотоксической и гемолитической активности (-3)Ltc1-K.

Сравнительный анализ взаимодействия Ltc1-K и (-3)Ltc1-K с эритроцитами

Поиск возможных причин, определяющих различия в активности Ltc1-K и (-3)Ltc1-K, был продолжен на клеточном уровне. Сравнили особенности гемолиза при эквивалентных концентрациях Ltc1-K и (-3)Ltc1-K (4 и 30 мкМ соответственно), выбранных на основе концентрационных зависимостей гемолитического эффекта (рис. 1). Почти восьмикратная разница в концентрации пептидов в среде компенсировала отличия Ltc1-K и (-3)Ltc1-K по аффинности к цвиттер-ионным липидам (табл. 2) и теоретически обеспечивала одинаковое количество Ltc1-K и (-3)Ltc1-K, связанных на мембране клеток.

Взаимодействия пептидов с мембраной эритроцитов анализировали в реальном времени методом ЛСКМ с синхронной регистрацией изображений клеток в проходящем свете (для оценки морфологии эритроцитов) и флуоресцентных изображений, характеризующих проницаемость мембраны по затеканию в цитоплазму КФ (рис. 4). Способность ЛСКМ регистрировать флуоресценцию лишь от тонкого слоя вблизи фокуса объектива, устраняя сигналы от слоев, расположенных выше и ниже, критична

Рис. 3. Спектры КД Ltc1-K и его производных в фосфатно-солевом буфере (А) и в мицеллах из ЛМФХ (Б).



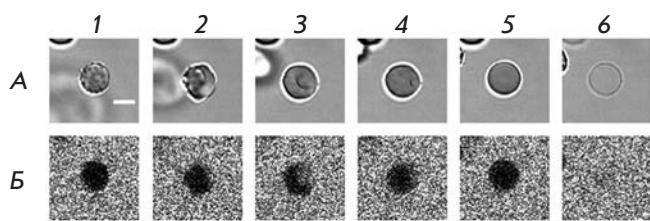


Рис. 4. Типичная последовательность трансформаций эритроцита в процессе гемолиза, индуцированного Ltc1-K. 1 – Эхиноцит, 2 – переход эхиноцита в стоматоцит, 3 – стоматоцит, 4 – переход стоматоцита в сфероцит, 5 – сфероцит, 6 – тень. А – Изображения эритроцита в разные моменты времени после внесения пептида, регистрируемые в проходящем свете. Б – Конфокальные флуоресцентные изображения распределения КФ вокруг и внутри эритроцита. Темная область на месте эритроцита свидетельствует об интактности плазматической мембраны и неспособности КФ проникать в цитоплазму. Масштабная черта 5 мкм.

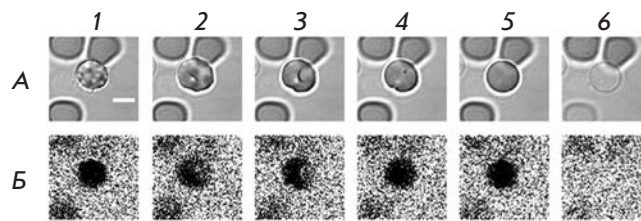


Рис. 5. Типичная последовательность трансформаций эритроцита в процессе гемолиза, индуцированного (-3)Ltc1-K. 1 – Эхиноцит, 2 – переход эхиноцита в стоматоцит, 3 – стоматоцит, 4 – переход стоматоцита в сфероцит, 5 – сфероцит, 6 – тень. А – Изображения эритроцита в разные моменты времени после внесения пептида, регистрируемые в проходящем свете. Б – Конфокальные флуоресцентные изображения распределения КФ вокруг и внутри эритроцита. Темная область на месте эритроцита свидетельствует об интактности плазматической мембраны и неспособности КФ проникать в цитоплазму. Масштабная черта 5 мкм.

для получения контрастных изображений распределения КФ вокруг и внутри клеток.

Воздействие Ltc1-K и (-3)Ltc1-K вызывает одинаково полное вытекание гемоглобина из части эритроцитов с превращением их в тени, а доля лизированных эритроцитов возрастает при увеличении концентрации пептидов в среде. Процесс гемолиза протекает очень неоднородно: часть эритроцитов не подвергается заметным изменениям, в части эритроцитов с разной задержкой после внесения пептида возникают морфологические изменения, которые завершаются образованием теней. Различия в отклике клеток не связаны с локальными градиентами концентраций добавляемых пептидов. Фактор высокой неоднородности распределения пептида в среде был исключен за счет тщательного и быстрого перемешивания равных объемов раствора пептида и суспензии клеток. Воздействие Ltc1-K и (-3)Ltc1-K вызывает одинаковую последовательность трансформаций эритроцитов (рис. 4, 5): дискоцит, эхиноцит, стоматоцит, сфероцит, тень. Время жизни эхиноцита варьирует в широком диапазоне (от нескольких минут до часа) и является лимитирующей стадией кинетики гемолиза. Длительность стадии стоматоцита составляет в среднем несколько минут. Сфероцит – наиболее короткоживущее состояние. Оно длится не более 10 с. Не обнаружено достоверных отличий в длительности отдельных стадий трансформации эритроцитов под действием обоих пептидов. Увеличение концентрации пептидов в среде приводит, в первую очередь, к снижению среднего времени жизни эхиноцитов.

Сходным для обоих пептидов образом мембрана эритроцита становится проницаемой для низкомо-

лекулярного маркера КФ только на этапе перехода сфероцита в тень (рис. 4–6). Появление КФ в цитоплазме детектируется одновременно с началом утечки гемоглобина из сфероцита (рис. 6), что указывает на формирование крупных мембранных дефектов без различимой в условиях нашего эксперимента промежуточной стадии образования маленьких липид-пептидных пор, проницаемых для КФ (гидродинамический диаметр молекулы ~0.5 нм), но непроницаемых для гемоглобина (гидродинамический диаметр 6.3 нм).

Обнаружено, что мембрана теней, образовавшихся под воздействием Ltc1-K и (-3)Ltc1-K, сохраняет проницаемость для КФ, в отличие от мембраны теней, возникающих после осмотического гемолиза эритроцитов, вызываемого заменой среды на дистиллированную воду (данные не показаны). Следовательно, Ltc1-K и (-3)Ltc1-K формируют стабильные липид-пептидные поры в мембране эритроцитов. Средний размер этих пор был оценен нами по способности меченных флуоресцеином декстранов различного размера проникать через поры внутрь теней. Обнаружено, что декстраны размером 40 кДа и менее, добавленные в среду к лизированным эритроцитам, легко проникают в тени, быстро выравнивая внутри- и внеклеточную концентрации. В то же время диффузия через поры внутрь теней декстранов размером 70 и 500 кДа затруднена (рис. 7, 8). При этом степень затекания ФД70 составляет около 70%, а ФД500 – менее 40% (рис. 8). Достоверной разницы в затекании ФД70 и ФД500 в тени, образованные под действием Ltc1-K и (-3)Ltc1-K, не обнаружено (рис. 8). С учетом гидродинамических диаметров ФД70 и ФД500

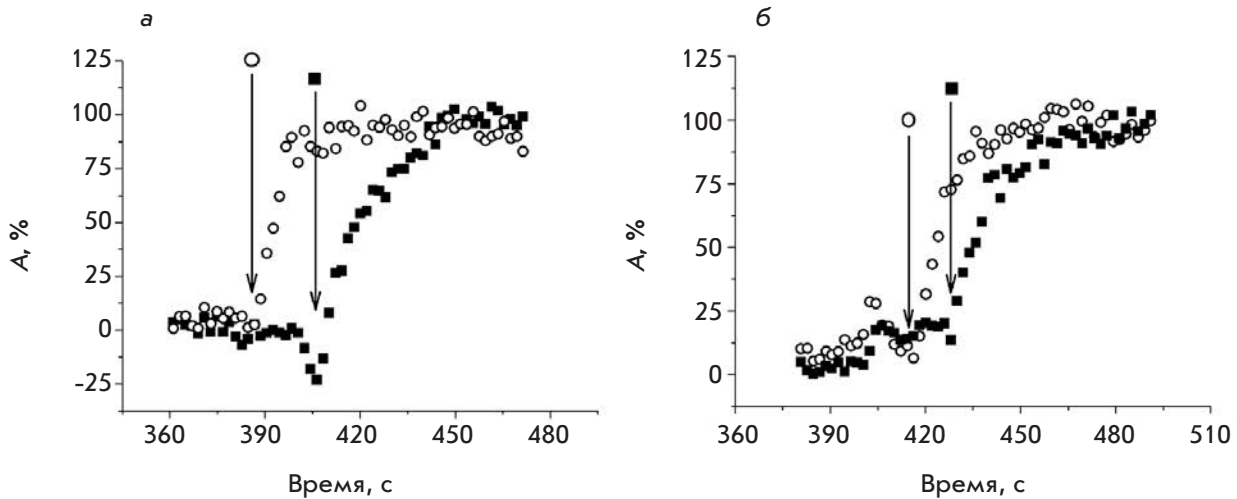
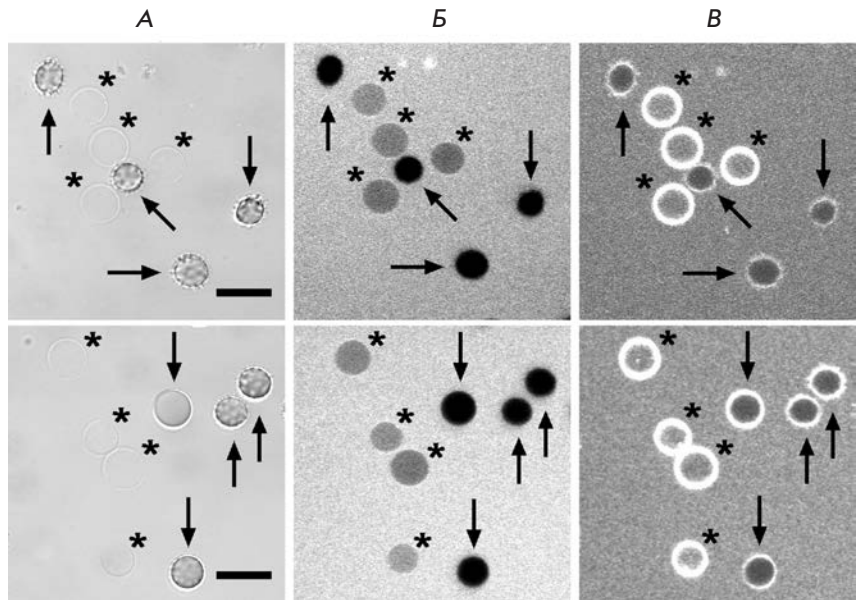


Рис. 6. Типичные кинетики затекания КФ в цитоплазму эритроцита в процессе гемолиза, индуцированного Ltc1-K (а) и (-3)Ltc1-K (б). На каждой панели представлены данные для двух клеток (○, ■). А – степень затекания КФ в эритроцит, рассчитанная в процентах по формуле (3). По оси абсцисс – время после внесения пептида в среду. Задержка между внесением пептида и началом гемолиза индивидуальна для каждого эритроцита и в значительной степени определяется временем в состоянии эхиноцита. Стрелкой обозначен момент начала утечки гемоглобина, регистрируемый по изображениям клетки в проходящем свете.

Рис. 7. Анализ способности ФД500 проникать через мембранные поры внутрь тени, образованных в результате воздействия Ltc1-K (верхняя панель) или (-3)Ltc1-K (нижняя панель). Изображения получены методом ЛСКМ от эритроцитов, к которым после воздействия пептидов добавлены ФД500 и мембранный маркер FM1-43. А – Изображения клеток в проходящем свете. Метка масштаба – 10 мкм. Б – Конфокальные флуоресцентные изображения распределения ФД500 вокруг и внутри эритроцитов. В – Конфокальные флуоресцентные изображения распределения FM1-43 на мембране эритроцитов. Звездочками отмечены тени с мембраной, ограниченно проницаемой для ФД500. Стрелками указаны эритроциты с мембраной, не проницаемой для ФД500.



(13 и 32 нм соответственно [17]) можно заключить, что Ltc1-K и (-3)Ltc1-K формируют в мембране эритроцита поры диаметром около 30 нм.

Таким образом, удаление N-концевого участка не влияет на характер, последовательность и продолжительность стадий трансформации эритроцитов в процессе гемолиза, а также на особенности формирования и размер пор в мембране. Это свидетельствует в пользу того, что механизм и особенности

взаимодействия Ltc1-K и (-3)Ltc1-K с эритроцитами одинаковы.

Модель взаимодействия Ltc1-K и (-3)Ltc1-K с эритроцитами может основываться на теории бислоистой пары [18–21]. Эта теория рассматривает асимметричную плазматическую мембрану как два белково-липидных слоя, способных к сравнительно независимой адаптивной деформации без нарушения контакта между ними. Теорию бислоистой пары

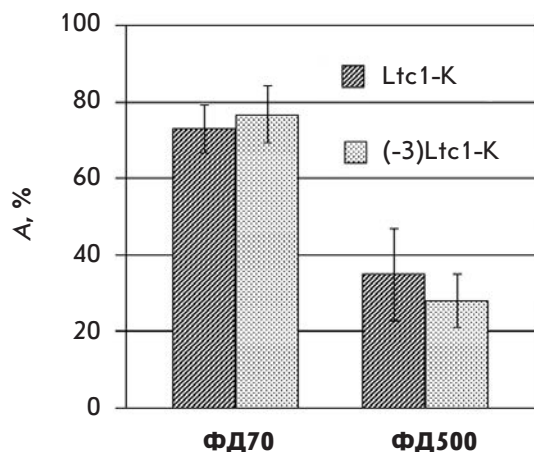


Рис. 8. Степень затекания (А) маркеров проницаемости мембраны ФД70 и ФД500 в тени, образованные в результате воздействия на эритроциты пептидов Ltc1-K и (-3)Ltc1-K. Представлены средние данные по выборке из 100–150 клеток.

часто используют для объяснения образования эхиноцитов и стоматоцитов под действием мембраноактивных агентов, в том числе АМП [18, 22, 23]. Согласно этой теории, образование эхиноцита обусловлено накоплением воздействующего соединения в наружном слое мембраны. Взаимодействия с любым соединением, растягивающие наружный слой относительно внутреннего, приводят к образованию «шипов»-выпячиваний на мембране, которые являются характерной особенностью эхиноцитов. В свою очередь, формирование стоматоцита вызывается накоплением соединения во внутреннем слое и его деформацией, которая завершается преобразованием дискоцита в сфероид с впадиной на мембране.

Объяснение трансформаций эритроцита под воздействием Ltc1-K и (-3)Ltc1-K на основе теории бислошной пары осложнено тем, что сценарии образования эхиноцита и стоматоцита рассматриваются как альтернативные. Если предположить, что перемещение соединения с наружного на внутренний слой сопровождается трансформацией эхиноцита в дискоцит, то взаимодействия Ltc1-K и (-3)Ltc1-K с эритроцитами могут быть объяснены следующим образом. Переход дискоцита в эхиноцит инициируется первоначальной адсорбцией пептида на поверхности эритроцита. Накопление связанного на внешней стороне мембраны пептида приводит к реорганизации липид-пептидных комплексов и созданию условий для транслокации пептида на внутреннюю поверхность плазматической мембраны, что и вызывает преобразование эхиноцита в стоматоцит. Следует

подчеркнуть, что предполагаемая транслокация пептида не сопровождается формированием структурированных дефектов бислоя, так как мембрана и эхиноцита, и стоматоцита непроницаема для КФ (рис. 4, 5). Переход стоматоцита в сфероцит, по-видимому, соответствует значительному накоплению катионного пептида во внутреннем слое мембраны, обогащенном отрицательно заряженными фосфолипидами, и созданию критического натяжения обоих слоев мембраны. Процесс завершается формированием липид-пептидных пор, которые уменьшают натяжение мембраны, а также создают условия для вытекания гемоглобина и образования тени.

Данная модель взаимодействий Ltc1-K и (-3)Ltc1-K с эритроцитами согласуется с регистрируемыми в эксперименте временами жизни отдельных стадий трансформации эритроцитов. Большие времена жизни эхиноцитов отражают длительный процесс постепенного накопления пептида на внешней стороне мембраны. При увеличении концентрации пептида в среде этот процесс ускоряется. Увеличение количества связанного на мембране пептида до критического уровня скачком повышает вероятность транслокации пептида на внутренний слой мембраны и значительно дестабилизирует мембрану, что выражается в ускорении последующих процессов, ведущих к гемолизу.

Все полученные нами данные указывают, что связывание пептида с внешним слоем мембраны эритроцитов, в составе которого доминируют цвиттер-ионные фосфолипиды, и накопление критического количества пептида на мембране являются спусковым механизмом процесса гемолиза. Удаление N-концевого участка Ltc1-K резко снижает способность пептида связываться на мембране, защищая тем самым эритроциты от гемолиза. Увеличение концентрации (-3)Ltc1-K в среде компенсирует нехватку связанного пептида, а все последующие стадии гемолиза с участием (-3)Ltc1-K протекают так же, как и в случае исходного пептида Ltc1-K.

Можно предположить, что механизм предсказанного нами для ряда линейных катионных АМП и показанного на примере латарцинов Ltc2a и Ltc5 снижения токсичности пептидов за счет удаления их N-концевых участков [5] сходен с механизмом, установленным для Ltc1-K. У АМП, организованных по схеме «неупорядоченный гидрофобный N-концевой участок + амфипатическая α-спираль», N-концевой участок, по-видимому, отвечает за эффективность связывания пептида с цвиттер-ионными мембранами клеток эукариот. Если аффинность N-концевого участка АМП к мембранам эукариот выше, чем к мембранам бактерий, то за счет удаления N-концевых аминокислот можно повысить безо-

пасность использования АМП в качестве антибактериального средства.

ВЫВОДЫ

Удаление трех N-концевых аминокислотных остатков Ltc1-K существенно снижает гемолитическую активность АМП, повышая тем самым избирательность его антибактериального действия.

Основная причина наблюдаемого эффекта – многократное уменьшение аффинности пептида к плазматической мембране клеток эукариот, обогащенной цвиттер-ионными фосфолипидами.

Гемолиз, вызываемый АМП Ltc1-K и его производным (-3)Ltc1-K – это сложный многостадийный процесс. Связывание пептидов с цвиттер-ионной мембраной эритроцитов сопровождается их переходом в α -спиральную конформацию. Связанные пептиды, дестабилизируя мембрану, трансформируют эритроцит из дискоцита в эхиоцит, затем в стоматоцит и сфероцит. При накоплении пептида на мембране в количестве, достаточном для образования пор, сфероцит подвергается гемолизу с образованием стабильных липид-пептидных пор диаметром около 30 нм. Роль N-концевого участка Ltc1-K заключается в усилении связывания пептида на мембране эритроцита. На особенности следующих стадий взаимодействия пептида с эритроцитом, приводящих к гемолизу, N-концевой участок не влияет. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и гранта Carl Zeiss.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hancock R.E.W., Chapple S.D. // Antimicrob. Agents Chemother. 1999. V. 43. P. 1317–1323.
- Finlay B.B., Hancock R.E.W. // Nat. Rev. Microbiol. 2004. V. 2. P. 497–504.
- Jenssen H., Hamill P., Hancock R.E.W. // Clin. Microbiol. Rev. 2006. V. 19. P. 491–511.
- Kozlov S.A., Vassilevski A.A., Feofanov A.V., Surovoy A.Y., Karpunin D.V., Grishin E.V. // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. P. 20983–20992.
- Polyansky A.A., Vassilevski A.A., Volynsky P.E., Vorontsova O.V., Samsonova O.V., Egorova N.S., Krylov N.A., Feofanov A.V., Arseniev A.S., Grishin E.V., et al. // FEBS Lett. 2009. V. 583. P. 2425–2428.
- Василевский А.А., Козлов С.А., Жмак М.Н., Куделина И.А., Дубовский П.В., Шатурский О.Я., Арсеньев А.С., Гришин Е.В. // Биоорган. химия. 2007. Т. 33. С. 405–412.
- Dubovskii P.V., Volynsky P.E., Polyansky A.A., Karpunin D.V., Chupin V.V., Efremov R.G., Arseniev A.S. // Biochemistry. 2008. V. 47. P. 3525–3533.
- Provencher S.W., Glockner J. // Biochemistry. 1982. V. 20. P. 33–37.
- Vassilevski A.A., Kozlov S.A., Samsonova O.V., Egorova N.S., Karpunin D.V., Pluzhnikov K.A., Feofanov A.V., Grishin E.V. // Biochem. J. 2008. V. 411. P. 687–696.
- Seelig J. // Biochim. Biophys. Acta. 2004. V. 1666. P. 40–50.
- Brogden K.A. // Nat. Rev. Microbiol. 2005. V. 3. P. 238–250.
- White S.H., Whimley W.C. // Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 1999. V. 28. P. 319–365.
- Yuan P., Fisher P.J., Prendergast F.G., Kemple M.D. // Biophys. J. 1996. V. 70. P. 2223–2238.
- Strandberg E., Ulrich A. // Concepts Magn. Reson. Part A. Bridg. Educ. Res. 2004. V. 23. P. 89–120.
- Fernandez D.I., Gehman J.D., Separovic F. // Biochim. Biophys. Acta. 2009. V. 1788. P. 1630–1638.
- Dathe M., Wieprecht T. // Biochim. Biophys. Acta. 1999. V. 1462. P. 71–87.
- Armstrong J.K., Wenby R.B., Meiselman H.J., Fisher T.C. // Biophys. J. 2004. V. 87. P. 4259–4270.
- Sheetz M.P., Singer S.J.J. // J. Cell Biol. 1976. V. 70. P. 247–251.
- Evans E.A. // Biophys. J. 1974. V. 14. P. 923–931.
- Iglič A., Kralj-Iglič V., Hägerstrand H. // Eur. Biophys. J. 1998. V. 27. P. 335–339.
- Lim G.H.W., Wortis M., Mukhopadhyay R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. P. 16766–16769.
- Isomaa B., Hägerstrand H., Paatero G. // Biochim. Biophys. Acta. 1987. V. 899. P. 93–103.
- Semrau S., Monster M.W., van der Knaap M., Florea B.I., Schmidt T., Overhand M. // Biochim. Biophys. Acta. 2010. V. 1798. P. 2033–2039.

УДК 577.123.383:579.852.11

Реконструкция пуринового метаболизма у *Bacillus subtilis* с целью получения штамма-продуцента AICAR – нового препарата широкого терапевтического применения

К. В. Лобанов, Л. Эрраис Лопес, Н. В. Королькова, Б. В. Тяглов, А. В. Глазунов,
Р. С. Шакулов, А. С. Миронов*

Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, 117545, Москва, 1-й Дорожный пр., 1

*E-mail: alexmir@genetika.ru

Поступила в редакцию 24.02.2011 г.

РЕФЕРАТ AICAR – природное соединение, аналог и предшественник аденозина. Будучи активатором протеинкиназы, активируемой AMP (АМПК), AICAR имеет широкий терапевтический потенциал, поскольку он нормализует углеводный и липидный обмен и ограничивает пролиферацию опухолевых клеток. Синтез AICAR в клетках *Bacillus subtilis* контролируется ферментами биосинтеза пуринов, гены которых входят в состав пуринового оперона (*pur*-оперона). Проведена реконструкция пуринового метаболизма в клетках штамма *B. subtilis*, направленная на сверхпродукцию AICAR. С этой целью из генома *B. subtilis* удалили ген *purH*, кодирующий формилтрансферазу/IMP-циклогидролазу, фермент, контролирующий превращение AICAR в IMP, что обеспечивает накопление AICAR. Для увеличения продукции AICAR в хромосому бактерий внесли инсерцию, инактивирующую ген-регулятор *purR* и делетировали терминатор транскрипции, расположенный в лидерной области *pur*-оперона. Кроме того, сконструирован экспрессионный интегративный вектор, содержащий сильный промотор гена *rpsF*, кодирующего рибосомный белок S6. В этот вектор под контроль промотора гена *rpsF* клонирован гетерологичный ген *purF* *Escherichia coli*, кодирующий первый фермент биосинтеза пуринов со снятой аллостерической регуляцией, а также модифицированный ген *prs* *E. coli*, ответственный за синтез предшественника пуринов – фосфорибозилпирофосфата (PRPP). Модифицированные гены *purF* и *prs* встроили в хромосому штамма-продуцента. Полученный в результате проведенных генетических манипуляций штамм *B. subtilis* накапливает 11–13 г/л AICAR в культуральной жидкости.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА противоопухолевый препарат AICAR, метаболизм пуринов, реконструкция генома, штамм-продуцент *Bacillus subtilis*.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ AICAR – 5-аминоимидазол-4-карбоксамидрибофуранозид; AICAR-P – нуклеотид-AICAR-фосфат; IMP – инозинмонофосфат; AMP – аденозинмонофосфат; АМПК – AMP-активируемая протеинкиназа; PRPP – фосфорибозилпирофосфат; GAR – 5-фосфорибозилглицинамидрибонуклеотид; GMP – гуанозинмонофосфат; ПЦР – полимеразная цепная реакция; КЖ – культуральная жидкость.

ВВЕДЕНИЕ

При всем разнообразии структурной организации генов, кодирующих ферменты биосинтеза пуриновых нуклеотидов, у различных организмов биохимия этого процесса консервативна: формирование пуринового цикла осуществляется на платформе рибозо-5-фосфата (все интермедиаты – нуклеотиды) с использованием одноуглеродного компонента (формиата и/или N10-формилтетрагидрофолата) [1].

Одноуглеродные соединения востребованы на двух этапах биосинтеза пуринов и соответственно при их недостатке могут накапливаться предшественники – фосфорибозилглицинамидрибонуклеотид (GAR) и 5-аминоимидазол-4-карбоксамидрибонуклеотид (AICAR-P). Среди них AICAR-P занимает особое положение, так как его формилирование и последующая циклизация завершают формирование пуринового гетероцикла с образованием инозин-

монофосфата (IMP) (рис. 1). Процесс превращения AICAR-P в IMP в клетках прокариот контролируется геном *purH*, который кодирует два домена с активностями AICAR-P-формилтрансферазы и IMP-циклогидролазы [2, 3]. Дальнейшие модификации IMP приводят к образованию АМР и GMP.

Несмотря на незавершенность структуры пуринового гетероцикла, AICAR-P является природным аналогом АМР, замещающим его в некоторых ферментативных реакциях *in vivo*. Наибольшее внимание за последнее десятилетие привлекает возможность замещения АМР в реакциях активации АМР-киназы (АМР-активируемая протеинкиназа) млекопитающих. АМРК – глобальный регулятор метаболических процессов, обеспечивающих энергетический статус организма эукариот [4, 5]. Для активации АМРК *in vivo* удобно использовать нуклеозид AICAR, который в клетках быстро фосфорилируется с образованием AICAR-P, аналога АМР. Появление AICAR-P имитирует накопление АМР и провоцирует перестройку энергетических процессов, направленную на преодоление мнимого энергетического стресса. Благодаря способности активировать АМРК препараты AICAR обладают широким терапевтическим потенциалом, поскольку они нормализуют углеводный [6] и липидный обмен [7]. Имитируя состояние энергетического стресса, AICAR подавляет рост опухолевых клеток [8]. Показана эффективность AICAR в предупреждении сахарного диабета типа 2 [9]. AICAR индуцирует апоптоз, он эффективен при хронических [10] и острых лейкозах [11].

Цель настоящей работы состояла в получении штамма-продуцента AICAR путем направленной реконструкции пуринового метаболизма в клетках *B. subtilis*. Выбор *B. subtilis* обусловлен тем, что генетический контроль и регуляция пуринового метаболизма у этих бактерий изучены достаточно подробно. Кроме того, штаммы рода *Bacillus* уже давно используются в качестве продуцентов пуриновых нуклеозидов и нуклеотидов, таких, как инозин, инозиновая и гуанозиновая кислоты [12, 13].

Пуриновый оперон *B. subtilis* – *purEKBCSQLFMNHD* (далее обозначаемый как *pur*-оперон), кодирует ферменты синтеза IMP – главного промежуточного соединения при биосинтезе пуриновых нуклеотидов (рис. 1).

Группа из 12 сцепленных генов, образующих *pur*-оперон, локализована в районе 55° на хромосоме *B. subtilis* (рис. 2) [14]. Экспрессия *pur*-оперона *B. subtilis* находится под двойным негативным контролем, в котором участвуют белок-репрессор PurR [15] и терминатор транскрипции, расположенный в лидерной области оперона [16]. Показано, что низкомолекулярным эффектором белка PurR служит

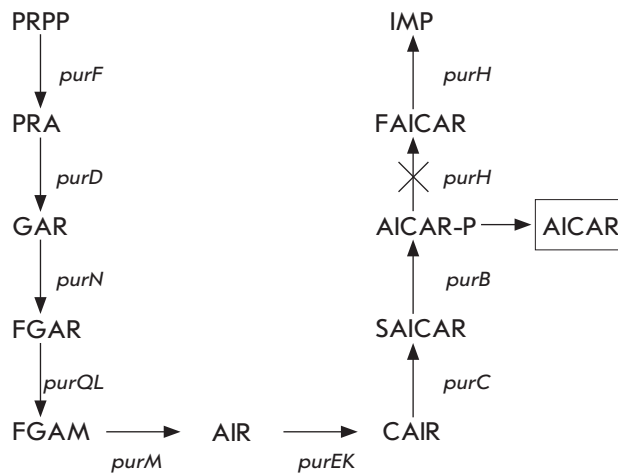


Рис. 1. Схема биосинтеза пуриновых нуклеотидов *de novo*. PRPP – 5'-фосфорибозил-1-пирофосфат, PRA – 5'-фосфорибозиламин, GAR – 5'-фосфорибозилглицинамид, FGAR – 5'-фосфорибозил-N-формилглицинамид, FGAM – 5'-фосфорибозил-N-формилглицинамидин, AIR – 5'-фосфорибозил-5-аминоимдазол, CAIR – 5'-фосфорибозил-5-аминоимдазол-4-карбоксилат, SAICAR – 5'-фосфорибозил-4(N-сукцинокарбоксамид)-5-аминоимдазол, AICAR-P – 5'-фосфорибозил-4-карбоксамид-5-аминоимдазол, FAICAR – 5'-фосфорибозил-4-карбоксамид-5-формамидоимдазол, IMP – инозин-5'-монофосфат, AICAR – 5-аминоимдазол-4-карбоксамидрибофуранозид.

PRPP [15], тогда как в качестве модулятора, усиливающего терминацию транскрипции перед первым структурным геном оперона, выступает гуанин [17]. Позднее выяснилось, что 5'-нетранслируемая область мРНК выполняет сенсорную функцию в отношении метаболита-эффектора гуанина и служит так называемым рибопереключателем [18, 19], обеспечивающим преждевременную терминацию транскрипции оперона [20, 21].

Таким образом, на первом этапе работы по получению штамма-продуцента AICAR необходимо было обеспечить максимальную экспрессию генов *pur*-оперона, устранив его негативную регуляцию под действием белка-репрессора PurR и терминатора транскрипции в лидерной области оперона. После этого из генома полученного штамма удалили ген *purH*, кодирующий формилтрансферазу/IMP-циклогидролазу, участвующую в синтезе AICAR. Инактивация этого фермента должна обеспечивать внутриклеточное накопление AICAR (рис. 1). На следующем этапе работы необходимо было увеличить пул основного предшественника синтеза пуринов *de novo* – PRPP. PRPP синтезируется из рибозо-5-

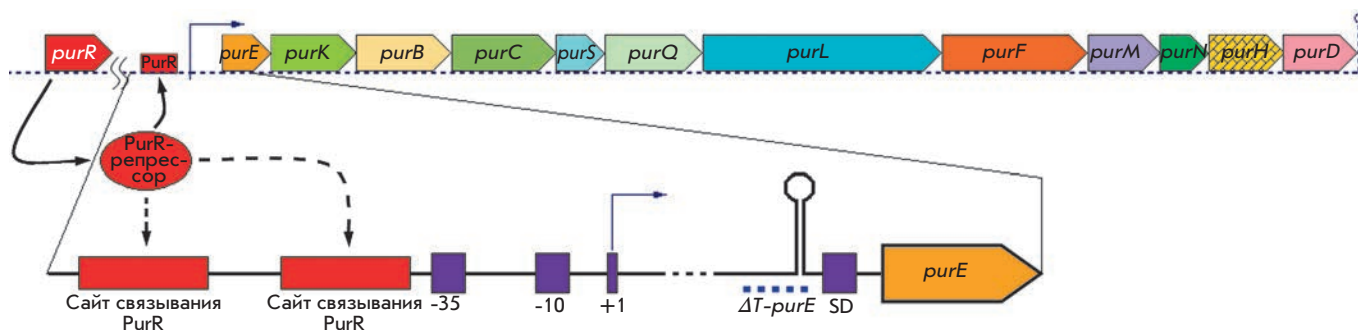


Рис. 2. Схема структурной организации *pur*-оперона и его регуляции. В верхней части рисунка показано относительное расположение 12 сцепленных структурных генов, образующих *pur*-оперон, и не сцепленный с ними ген *PurR*, кодирующий белок-репрессор *pur*-оперона. В нижней части рисунка представлена лидерная область *pur*-оперона с указанием сайтов связывания белка-репрессора PurR, сайта связывания РНК-полимеразы (-35 – -10), старта транскрипции (+1), терминатора транскрипции (в виде шпильчатой структуры) и сайта связывания рибосом (SD); пунктиром обозначен делегированный участок (ΔT -*purE*) лидерной области.

фосфата под контролем PRPP-синтазы, кодируемой геном *prs*. Этот фермент подвержен аллостерической регуляции с участием пуриновых нуклеотидов. Структурно-функциональная организация PRPP-синтазы, более детально изучена у бактерий *E. coli*, у которых получен мутантный вариант этого фермента со снятой аллостерической регуляцией [22]. Учитывая эти данные, был проведен сайт-направленный мутагенез гена *prs E. coli*, направленный на получение мутантного фермента, не подверженного ретроингибированию пуриновыми нуклеотидами, с целью его последующего переноса в клетки *B. subtilis*.

Еще одно препятствие для повышения продукции AICAR представляет аллостерическая регуляция первого фермента собственно пуринового биосинтеза – глутамин-PRPP-аминотрансферазы, кодируемой геном *purF* [23]. Известно, что глутамин-PRPP-аминотрансфераза из *E. coli*, в отличие от фермента *B. subtilis*, не подвержена инактивации в стационарной стадии роста бактерий [24]. Кроме того, у *E. coli* описан мутантный вариант этого фермента, устойчивый к ингибированию пуриновыми нуклеотидами [25]. Поэтому и в этом случае было решено использовать модифицированную сайт-направленным мутагенезом глутамин-PRPP-аминотрансферазу из *E. coli* с целью последующего ее переноса в клетки *B. subtilis*. Для оптимальной экспрессии модифицированных генов *prs* и *purF E. coli* в клетках *B. subtilis* на основе плазмиды pDG268 был сконструирован экспрессионный интегративный вектор, содержащий сильный промотор гена *rpsF*, кодирующего рибосомный белок S6. Наконец, на последнем этапе работы полученный вектор после клонирования в него генов *prs* и *purF E. coli* под контролем промотора гена *rpsF* встроили в хромосому штамма-продуцента AICAR *B. subtilis*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Бактериальные штаммы и плазмиды

Использованные в работе бактериальные штаммы и плазмиды представлены в табл. 1. Штамм *B. subtilis* AM732 получен путем трансформации штамма Mu8u5u6 хромосомной ДНК, выделенной из штамма *B. subtilis* 168 с отбором трансформантов Pur⁺. Штамм AM743 получен путем трансформации штамма AM732 хромосомной ДНК, выделенной из штамма *B. subtilis* LCC28 с отбором трансформантов Neo^R на среде с неомицином.

Среды и условия культивирования

В качестве полноценной питательной среды для выращивания бактерий использовали среду LB [31] или стандартную минимальную среду Спицайзена с необходимыми добавками [26]. Аминокислоты добавляли в количестве 50 мкг/мл. В качестве источника углерода использовали глюкозу (0.4%). При необходимости в среду добавляли: ампициллин (Amp) – 100 мкг/мл, хлорамфеникол (Cm) – 10 мкг/мл, эритромицин (Em) – 1 мг/мл, неомицин (Neo) – 5 мг/мл. Метионин и лейцин добавляли в концентрации 50 мкг/мл. В случае пуриновых ауксотрофов в качестве источника пуринов использовали гипоксантин, аденин или гуанин (20 мкг/мл).

Трансформирующую ДНК *B. subtilis* выделяли по методу Сайто и Миуры [32], эксперименты по трансформации проводили по Анагностопулосу и Спицайзену [26].

Манипуляции с плазмидной ДНК

Выделение плазмидной ДНК, клонирование, трансформацию в клетки *E. coli* и анализ рекомбинантных

Таблица 1. Используемые в работе бактериальные штаммы и плазмиды

Штаммы, плазмиды	Генотип	Происхождение
<i>Bacillus subtilis</i>		
168	<i>trpC</i>	[26]
Mu8u5u6	<i>leu met purF</i>	[27]
LCC28	<i>purR::neo</i>	[28]
AM747	<i>trpC purH::(pMutin2purH'-lacZ) ΔT-purE</i>	[21]
AM732	<i>leu met</i>	Данная работа
AM743	<i>leu met purR::neo</i>	«
AM764	<i>leu met purR::neo ΔT-purE</i>	«
AM778	<i>leu met purR::neo ΔT-purE ΔpurH</i>	«
AM793	<i>leu met ΔpurH</i>	«
AM811	<i>leu met purR::neo ΔT-purE ΔpurH amyE::[P_{trnSF}-prs_E]</i>	«
AM813	<i>leu met purR::neo ΔT-purE ΔpurH amyE::[P_{trnSF}-purF_E]</i>	«
AM815	<i>leu met purR::neo ΔT-purE ΔT ΔpurH amyE::[P_{trnSF}-prs_E-purF_E]</i>	«
<i>E. coli</i>		
TG1	<i>thi supE hsdΔ5 Δ(lac-proAB)/F' tra Δ36 proAB⁽⁺⁾ lacI^(q) lacZ ΔM15</i>	ВКПМ
MG1655	Прототроф	[29]
Плазмиды		
pDG268	Ap ^r (<i>E. coli</i>) Cm ^r (<i>B. subtilis</i>)	[18]
pNZT1	Em ^r	[30]
pLE1	как pDG268, но содержит промотор P _{trnSF}	Данная работа
pLE2	как pLE1, но содержит ген <i>prs_E</i>	«
pLE3	как pLE1, но содержит ген <i>purF_E</i>	«
pLE4	как pLE1, но содержит гены <i>prs_E</i> и <i>purF_E</i>	«

плазмид проводили с использованием стандартных методов [31].

Препараты ферментов

Эндонуклеазы рестрикции, T4-ДНК-лигаза, термостабильная Taq-полимераза получены от компании «Fermentas».

Полимеразная цепная реакция

ПЦР проводили на приборе MyCycler (компания «Bio-Rad Laboratories»). Температурный режим подбирали с учетом длины амплифицированного фрагмента, длины и состава используемых праймеров. Выделение и очистку ПЦР-продуктов проводили с использованием набора Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (компания «Fermentas»).

Сайт-направленный мутагенез

Сайт-направленный мутагенез проводили с помощью ПЦР с использованием специфических олигонуклеотидных праймеров. Состав праймеров и их характеристика приведены в табл. 2. Присутствие соответствующих мутаций проверяли секвенированием по методу Сэнгера [33].

Условия ферментации

Проверяли способность штаммов, полученных в ходе работы, накапливать AICAR в культуральной жидкости (КЖ). Посевную культуру штаммов культивировали при 37°C в течение 18 ч на LB-бульоне. Затем по 0.5 мл культуры добавляли к 4.5 мл ферментационной среды в пробирках 20 x 200 мм и культивировали при 37°C в течение 72 ч на роторной качалке. Состав ферментационной среды (%): соевая мука – 3, кормовые дрожжи – 1, кукурузный экстракт – 5, (NH₄)₂HPO₄ – 0.6, мочевины – 0.4, сахар (пищевой) – 15, pH 7.0.

Определение концентрации AICAR в культуральной жидкости

КЖ, полученную в процессе ферментации, центрифугировали для освобождения от клеток, после чего в супернатанте определяли концентрацию AICAR методом количественной тонкослойной хроматографии на пластинках Сорбфил. Состав разработанной нами элюирующей системы: хлороформ-метанол-25% водный раствор аммиака в объемном соотношении 5 : 3 : 1. В качестве альтернативного метода использовали количественную ВЭЖХ на хрома-

Таблица 2. Олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе

Праймер	Ген	Нуклеотидная последовательность*	Координаты**	
			5'	3'
N1	<i>purN_B</i>	ccccgcgggcggaacgattccacat (SacII)	+135	+154
N2	<i>purN_B</i>	cgctgcagttcttttcgaaaggaacga (PstI)	+652	+630
D1	<i>purD_B</i>	cgctgcagttcacaacattaaggggatgaaaa (PstI)	-28	-5
D2	<i>purD_B</i>	cgcggtaccttttctgcacatatgcc (KpnI)	+410	+389
F1	<i>purF_E</i>	cgcatcgataggaggtgcaaacagatgtcggtattgtcggtatc (ClaI)	+1	+22
F2	<i>purF_E</i>	cgcgctcagcgaaggcatcatcct (EspI)	+1530	+1511
F3	<i>purF_E</i>	gggcttcgttCaaccgctat	+968	+991
F4	<i>purF_E</i>	atagcggttttGaacgaagccc	+991	+968
F5	<i>purF_E</i>	ggtattgatatgTGgagcgccacgg	+1216	+1242
F6	<i>purF_E</i>	ccgtggcgctcCAcatatcaatacc	+1242	+1216
P1	<i>prs_E</i>	cgcgatccaaggaggttctctcAtgctgatatga (BamHI)	-21	+3
P2	<i>prs_E</i>	cccatcgatgccgggttcgattagtgttcga (ClaI)	+949	+928
P3	<i>prs_E</i>	ctgacagtggCtctgcacgctg	+366	+377
P4	<i>prs_E</i>	agcgtgcagaGccactgtcagc	+377	+366
R1	<i>rpsF_B</i>	cgcgaattcttgcggcgccgggtat (EcoRI)	-223	-205
R2	<i>rpsF_B</i>	cgcgatccataatgggcaaggagcaat (BamHI)	-31	-51

*Последовательность праймеров дана в ориентации 5'–3'. Заглавными жирными буквами указаны нуклеотидные замены, введенные в праймеры для проведения сайт-направленного мутагенеза. Подчеркнуты сайты узнавания рестриктаз, приведенных в скобках.

**Координаты 5'- и 3'-концов праймеров указаны относительно старта трансляции соответствующих генов. Гены *B. subtilis* обозначены знаком _(B), а *E. coli* – знаком _(E).

тографе системы «ALLIANCE» (Separations Module Waters 2695, Photodiode Array detector Waters 2996).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Усиление экспрессии *pur*-оперона *B. subtilis*

В работе, посвященной изучению регуляции экспрессии *pur*-оперона *B. subtilis* [21], мы показали, что при повреждении гена *purR*, кодирующего белок-репрессор оперона, наблюдается почти 20-кратное усиление экспрессии репортерного гена *lacZ*, встроенного в ген *purH*, по сравнению с экспрессией в штамме дикого типа. При делетировании из генома штамма дикого типа 94 п.н., захватывающих Rho-независимый терминатор транскрипции (ΔT -*purE*), который расположен в лидерной области *pur*-оперона (рис. 2), экспрессия репортерного гена *lacZ* увеличивалась примерно в 10 раз. Однако при объединении обеих мутаций обнаруживался ярко выраженный синергичный эффект: экспрессия гена *lacZ* возрастала более чем в 200 раз. Учитывая эти данные, на первом этапе конструирования штамма-продуцента AICAR были проведены опыты

по инактивации гена *purR* и делеции терминатора транскрипции (ΔT -*purE*).

В качестве исходного материала использовали штамм AM732 – Pur⁺-производный штамма Ми8и5и6 (табл. 1), охарактеризованного ранее [21]. Для перенесения в геном штамма AM732 инсерции *purR::neo*, полностью инактивирующей синтез белка-репрессора PurR, штамм AM732 трансформировали хромосомной ДНК, выделенной из штамма LCC28 (*purR::neo*), с отбором устойчивых к неомицину (Neo^R) рекомбинантов. В результате для дальнейшей работы отобрали штамм AM743 *purR::neo* (табл. 1). Делецию ΔT -*purE* в геноме штамма AM743 *purR::neo* получали по следующей схеме. Первоначально получили протяженную делецию ΔL -*E*, полностью перекрывающую лидерную область *pur*-оперона и частично первый структурный ген *purE*, что привело к появлению ауксотрофности по пуринам. Получение такой делеции детально описано в работе [21]. В делеционный вариант штамма AM743 *purR::neo* ΔL -*E* с помощью трансформации ДНК, выделенной из штамма AM747 (табл. 1), переносили делецию терминатора транскрипции ΔT -*purE*, отбирая трансформанты Pur⁺

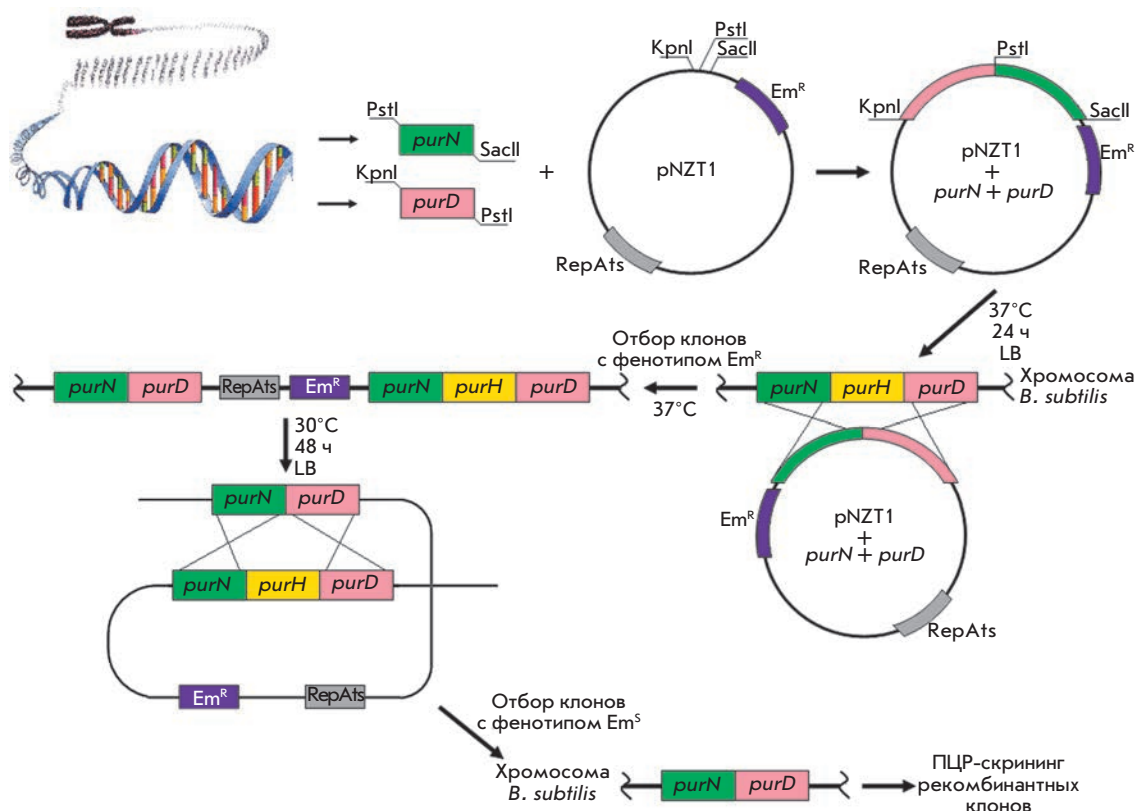


Рис. 3. Схема получения делеции структурного гена *purH* с использованием метода, описанного в работе [30].

на минимальной среде Спицайзена, не содержащей пуринов. В результате получили штамм AM764, содержащий в геноме инсерцию *purR::neo* и делецию терминатора транскрипции ΔT -*purE*.

Получение делеции гена *purH* в составе хромосомы *B. subtilis*

Из схемы биосинтеза пуринов (рис. 1) следует, что для внутриклеточного накопления AICAR необходимо инактивировать формилтрансферазу/IMP-циклогидролазу, кодируемую геном *purH*. Делеция гена *purH* в составе хромосомы *B. subtilis* получена методом [30], основанным на использовании специально сконструированной плазмиды pNZT1 – производной интегративного вектора rKS1 [34]. Плазмида pNZT1 содержит маркер устойчивости к эритромицину (*Em^R*) и полилинкер с множественными сайтами рестрикции для клонирования целевых фрагментов хромосомной ДНК, но, что самое главное, ее репликация чувствительна к температуре: при 30°C плазмида существует в автономном состоянии, однако при температуре 37°C репликация блокируется, и плазмида может встроиться в хромосому за счет гомологичной рекомбинации, если в ее составе клонирован какой-либо хромосомный фрагмент (рис. 3). Поскольку интеграция плазмиды в хромосому происходит в результате единичного акта рекомбинации в обла-

сти гомологии между клонированным фрагментом и хромосомой, сайт интеграции плазмиды в хромосому оказывается фланкированным гомологичными дублированными последовательностями. Культивирование таких бактерий при температуре 30°C (пермиссивной для репликации плазмиды pNZT1) может приводить к ее выщеплению из хромосомы с захватом одной из копий фланкированных последовательностей хромосомы, что позволяет заменять дикий аллель любого гена хромосомы на мутантный, клонированный в составе плазмиды pNZT1 (рис. 3).

Указанное свойство плазмиды pNZT1 использовано для делетирования гена *purH*. С этой целью проведена ПЦР-амплификация фрагментов хромосомы, фланкирующих ген *purH*. С использованием праймеров N1 и N2 (табл. 2) амплифицировали дистальный участок размером 517 п.н. гена *purN*, примыкающий к 5'-концу гена *purH*, и клонировали по сайтам узнавания рестриктаз *SacII* и *PstI* в плазмиду pNZT1. На следующем этапе с участием праймеров D1 и D2 (табл. 2) амплифицировали проксимальный участок размером 442 п.н. гена *purD*, примыкающий к 3'-концу гена *purH*, и клонировали по сайтам узнавания рестриктаз *PstI* и *KpnI* в полученную на предыдущем этапе плазмиду pNZT1, содержащую вставку фрагмента гена *purN*. Сконструированной таким образом плазмидой трансформировали штамм *E. coli*

TG1. Трансформанты Em^R отбирали на среде с эритромицином (300 мкг/мл) при 30°C. С помощью ПЦР проверяли присутствие в полученных клонах плазмиды pNZT1 с клонированными фрагментами генов *purN* и *purD*. Выделенными из проверенных клонов плазмидами pNZT1-*purN-purD* трансформировали штамм AM764 *purR::neo ΔT-purE*. Отбор трансформантов Em^R проводили на среде с эритромицином (3 мкг/мл). Несколько клонов Em^R культивировали в жидкой среде LB с эритромицином (3 мкг/мл) при 37°C в течение ночи, а затем рассеивали на чашки со средой LB с эритромицином (3 мкг/мл) и инкубировали в течение 24 ч при 37°C. Рекомбинанты Em^R формировались в результате интеграции плазмиды pNZT1-*purN-purD* в соответствующий хромосомный локус, что подтверждали ПЦР-амплификацией фрагмента размером 2413 п.н. при использовании праймеров N1 и D2. Несколько клонов Em^R засеивали в жидкую LB-среду без антибиотика и инкубировали на качалке при 30°C в течение 48 ч, а затем рассеивали на чашки со средой LB без антибиотика и инкубировали еще 24 ч при 30°C. Выросшие клоны проверялись на выщепление интегрированной плазмиды pNZT1, о чем судили по появлению эритромицинчувствительных клонов. Как отмечалось выше, выщепление плазмиды может сопровождаться либо сохранением в составе хромосомы аллеля дикого типа гена *purH*, либо заменой этого аллеля на делецию $\Delta purH$ (рис. 3). Интеграцию (перенос) делеции $\Delta purH$ в хромосому штамма AM764 *purR::neo ΔT-purE* подтверждали наработкой ПЦР-фрагмента размером 2413 п.н. с участием праймеров N1 и D2. Один из вариантов штамма AM764 *purR::neo ΔT-purE*, включившего делецию $\Delta purH$ и названный AM778, накапливал до 4–5 г/л AICAR в КЖ и рос на минимальной среде только при добавлении гипоксантина, аденина или гуанина, что подтверждало наличие в его геноме дефектного гена *purH*. Параллельно был сконструирован контрольный штамм AM793, содержащий $\Delta purH$, но не несущий мутаций *purR::neo* и $\Delta T-purE$, которые обеспечивают дерепрессию ферментов биосинтеза пуринов.

Для повышения продуктивности полученного штамма было целесообразно увеличить внутриклеточное содержание PRPP – ключевого предшественника биосинтеза пуринов (рис. 1). Известно, что PRPP-синтазы, ответственные за синтез PRPP в клетках как *B. subtilis* [35], так и *E. coli* [36], подвержены аллостерическому ингибированию пуриновыми нуклеотидами, в том числе, вероятно, и фосфорилированными производными AICAR. Как отмечалось во «Введении», описан мутантный вариант PRPP-синтазы *E. coli*, не подверженный аллостерической регуляции [22]. Поэтому была поставлена задача по-

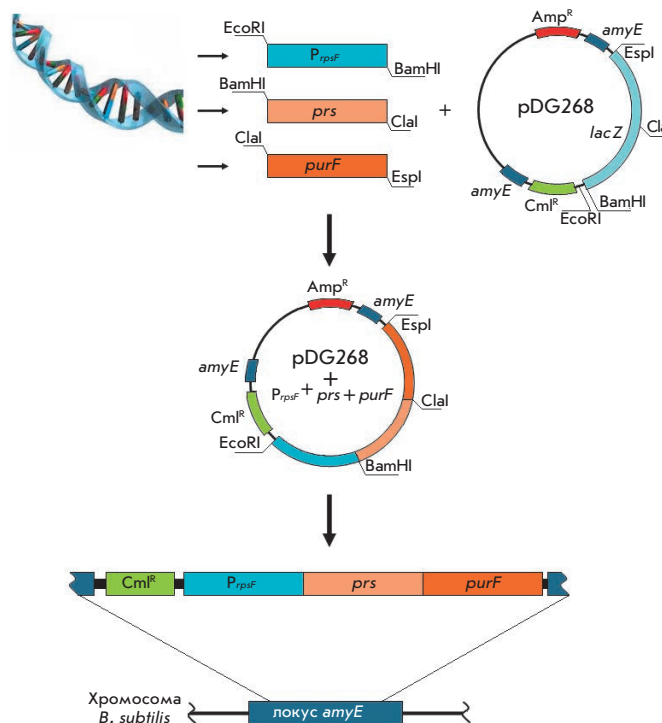


Рис. 4. Схема клонирования генов *prs* и *purF* *E. coli* под контролем промотора гена *rpsF* *B. subtilis* в составе плазмиды pDG268 и их интеграции в хромосому *B. subtilis*.

лучить аналогичный мутантный фермент *E. coli*, клонировать его и оптимизировать экспрессию в клетках штамма-производителя AM778. Однако, прежде чем приступить к этой работе, необходимо было сконструировать интегративный экспрессионный вектор, обеспечивающий высокий уровень экспрессии гетерологичных генов *E. coli* в клетках *B. subtilis*.

Конструирование интегративного экспрессионного вектора на основе плазмиды pDG268

В качестве исходного материала для получения интегративного экспрессионного вектора была выбрана плазмида pDG268. Эта плазмида способна реплицироваться в клетках *E. coli*, но не *B. subtilis*, однако при введении в клетки *B. subtilis* она может интегрироваться в хромосомный локус *amyE* *B. subtilis*. Плазмида pDG268 содержит кассету, которая включает полилинкер для клонирования, репортерный ген *lacZ* без собственного промотора и ген устойчивости к хлорамфениколу (Cm^R) (рис. 4). Кассета фланкирована фрагментами гена *amyE*, что позволяет встраивать вектор с клонированным фрагментом в локус *amyE* на хромосоме *B. subtilis*.

В качестве промотора, способного обеспечить высокий уровень экспрессии клонированных генов

cgcgaa R1 (EcoRI)
 tatgaggatccttcttgccggggcggtatggcaggagctaagaggcaggaaaagtccgc
 atactcctagaagaacgcccgcgccataccgtcctcgatttctccgtccttttcaggcg
 cttgaagggaaagaatatgtgggtccaagacggagatgttattcatttccgatttaatgta
 gaacttcctttcttatacaccagggttctgcctctacaataagtaaaggctaaattacat
 -35 -10 +1
 taggatgcagTTGTAAagggacaagagctttggTATAATataaaattgtgagtaatagaa
 atcctacgtcaacatttccctggttctcgaaacatattatatttttaacactcattatctt
 ttattgctccttgcccattatgg
 aataacgaggaacgggtaataacc
 R2 (BamHI) taggcgc

Рис. 5. Нуклеотидная последовательность промотора гена *rpsF*. Жирным выделены последовательности -10 и -35 промотора и старт транскрипции (+1). Рамкой обведен UP-элемент промотора. Нуклеотидная последовательность праймеров, использованных для клонирования промотора, обозначена синим.

E. coli в клетках *B. subtilis*, был выбран промотор гена *rpsF*, кодирующего рибосомный белок S6 у бацилл. Известно, что промоторы генов рибосомных белков относятся к наиболее сильным промоторам *B. subtilis*, их экспрессия координирована со скоростью роста бактерий и достигает максимума на логарифмической стадии роста [37, 38]. Нуклеотидная последовательность промотора гена *rpsF* представлена на рис. 5. Как следует из рис. 5, промотор P_{rpsF} содержит каноническую последовательность -10, последовательность -35, близкую к канонической, а также АТ-богатую область в районе -70...-50 п.н., так называемый UP-элемент, обеспечивающий более эффективную инициацию транскрипции [39].

С целью клонирования промотора P_{rpsF} в плазмиду pDG268 фрагмент ДНК, содержащий промоторную область гена *rpsF*, амплифицировали методом ПЦР с хромосомы *B. subtilis* 168 с использованием праймеров R1 и R2 (табл. 2). Полученный ПЦР-фрагмент обрабатывали эндонуклеазами рестрикции EcoRI и BamHI и клонировали в плазмиду pDG268, обработанную теми же рестриктазами (рис. 4). Лигазной смесью трансформировали штамм *E. coli* TG1. Трансформанты, несущие вставку искомого фрагмента, отбирали на индикаторной среде, содержащей ампициллин в концентрации 120 мкг/мл и X-gal. Колонии трансформантов имели ярко-голубую окраску, так как репортерный ген *lacZ* оказывался под контролем клонированного промотора P_{rpsF} . Присутствие вставки подтверждали с помощью ПЦР с использованием праймеров R1 и R2. Затем полученную плазмиду встраивали в хромосомный локус *amyE* *B. subtilis* путем отбора устойчивых к хлорамфениколу (Cm^R) трансформантов. Схема интеграции вектора pDG268 с клонированным промотором гена *rpsF* представлена на рис. 4. Определение активности β -галактозидазы в этих трансформантах показало, что экспрессия ре-

портерного гена *lacZ* под контролем промотора P_{rpsF} почти на порядок превышала экспрессию этого гена под контролем обычных промоторов, например природного промотора *pur*-оперона (данные не представлены). Сконструированный вектор назван pLE1.

Сайт-направленный мутагенез гена *prsE* *E. coli* (prs_E)

Согласно опубликованным данным, специфическая мутация в гене *prsE*, приводящая к замене Asp128 \rightarrow Ala в PRPP-синтазе, приводит к снятию ретроингибирования фермента пуриновыми нуклеотидами [22]. Для получения аналогичной мутации осуществлен синтез олигонуклеотидных праймеров P3 и P4 (табл. 2), содержащих замены нуклеотидов (обозначены заглавными буквами), приводящие к образованию мутантного белка с заменой Asp128 \rightarrow Ala. На первом этапе амплифицировали ПЦР-фрагменты с участием двух пар праймеров: P4-P1 (фланкирует 5'-конец гена *prsE* и содержит сайт узнавания для рестриктазы BamHI) и P3-P2 (фланкирует 3'-конец гена *prsE* и содержит сайт узнавания для рестриктазы ClaI). Затем состыковали полученные фрагменты и амплифицировали полноразмерный ген *prsE* с использованием праймеров P1 и P2 (табл. 2). Важно подчеркнуть, что в 5'-область праймера P1 включена оптимизированная для экспрессии в бациллах нуклеотидная последовательность сайта связывания рибосомы (SD). На следующем этапе ПЦР-фрагмент P1-P2, содержащий мутантный ген *prsE*, клонировали в полученный ранее вектор pLE1 с использованием рестриктаз BamHI и ClaI. В результате получили плазмиду pLE2, содержащую мутантный ген *prsE* под контролем промотора P_{rpsF} . На заключительном этапе плазмиду pLE2 встроили в хромосомный локус *amyE* *B. subtilis* по описанной выше схеме (рис. 4). Полученный в результате интеграции плазмиды pLE2 штамм назван AM811 (табл. 1).

Сайт-направленный мутагенез гена *purF* *E. coli* (*purF_E*)

Первый фермент пуринового биосинтеза – глутамин-PRPP-аминотрансфераза (ген *purF*), играет ключевую роль в обеспечении нормального функционирования пути биосинтеза пуринов у *E. coli* и *B. subtilis* и подвержен еще более сложной по сравнению с PRPP-синтазой аллостерической регуляции с участием нуклеотидов [40]. Поэтому можно было ожидать, что использование мутантной глутамин-PRPP-аминотрансферазы из *E. coli*, аналогичной описанной в работе [25], позволит повысить продукцию АИКАР. Согласно данным [25], замена Lys326 → Gln в белке модифицирует сайт связывания GMP (А-сайт), а замена Pro410 → Trp – сайт связывания AMP (С-сайт), причем комбинация этих мутаций делает фермент практически устойчивым к действию любых пуриновых нуклеотидов. Сайт-направленный мутагенез гена *purF_E* проводили по схеме, описанной в предыдущем разделе. Для получения замены Lys326 → Gln синтезировали олигонуклеотидные праймеры F3 и F4, а для замены Lys326 → Gln – праймеры F4 и F5 (в табл. 2 соответствующие нуклеотидные замены выделены заглавными буквами и жирным шрифтом). После ПЦР-амплификации этих праймеров с фланкирующими праймерами F1 и F2 и последующей состыковкой ПЦР-фрагментов получен полно-размерный ген *purF_E*, кодирующий белок с обеими аминокислотными заменами. Как и в случае гена *prs_E*, в состав праймера F1 был введен оптимизированный для бацилл сайт SD. Модифицированный ген *purF_E* клонировали в плазмиду pLE1 под контроль промотора P_{trpF} по ClaI- и EspI-сайтам. Таким же образом клонировали модифицированный ген *purF_E* в плазмиду pLE2, содержащую ген *prs_E*. Соответствующие плазмиды получили наименование pLE3 и pLE4 (табл. 1). На заключительном этапе плазмиды pLE3 и pLE4 встроили в хромосомный локус *amyE* *B. subtilis* по описанной выше схеме (рис. 4). Полученные в результате интеграции плазмид pLE3 и pLE4 штаммы названы AM813 и AM815 соответственно (табл. 1).

Определение способности штаммов накапливать АИКАР

Для оценки способности полученных в ходе работы штаммов накапливать АИКАР проводили опыты по ферментации в условиях, описанных в разделе «Экспериментальная часть». Результаты этих опытов суммированы на рис. 6.

Как следует из данных, приведенных на рис. 6, исходный штамм AM732 практически совсем не накапливает АИКАР. Только после удаления из генома

Штамм	Накопление АИКАР в КЖ (г/л)
AM732 (дикий тип)	<0.0001
↓	
AM793 <i>ΔpurH</i>	0.5–0.8
↓	
AM778 <i>purR::neo ΔT-purE ΔpurH</i>	4–5
↓	
AM811 <i>purR::neo ΔT-purE ΔpurH amyE::[P_{trpF}-<i>prsE</i>]</i>	7–8
↓	
AM813 <i>purR::neo ΔT-purE ΔpurH amyE::[P_{trpF}-<i>purF_E</i>]</i>	9–10
↓	
AM815 <i>purR::neo ΔT-purE ΔpurH amyE::[P_{trpF}-<i>prsE</i>-<i>purF_E</i>]</i>	11–13

Рис. 6. Этапы конструирования штаммов-продуцентов АИКАР и их продуктивность.

этого штамма гена *purH* (штамм AM793) наблюдается незначительное (< 1 г/л) накопление АИКАР в КЖ. Мутации *purR::neo* и *ΔT-purE* (штамм AM788), обеспечивающие полную дерепрессию ферментов биосинтеза пуринов, приводят к существенному увеличению накопления АИКАР, до 4–5 г/л. Дальнейшее, почти двукратное, увеличение продуктивности отмечено у штаммов AM811 и AM813, экспрессирующих один из мутантных десенсибилизированных белков *E. coli* – PRPP-синтазу (ген *prs*) или глутамин-PRPP-аминотрансферазу (ген *purF*). Максимальное накопление АИКАР – до 11–13 г/л, обнаруживается у штамма AM815, характеризующегося полной дерепрессией ферментов биосинтеза пуринов и одновременно содержащего модифицированные гены *prs_E* и *purF_E* под контролем промотора P_{trpF}.

Интересно, что практически весь синтезируемый в клетках АИКАР экскретируется в КЖ: в специально проведенных нами опытах показано, что внутриклеточная концентрация АИКАР составляет не более 2% от его концентрации в среде. Механизм экскреции АИКАР не известен, хотя имеются данные, что в процессе его экспорта из клеток бацилл принимает участие мембранный белок, кодируемый геном *rbuE* [41].

Этапы конструирования продуцента АИКАР направлены на стимуляцию биосинтеза пуриновых нуклеотидов, следовательно, АИКАР, обнаруживаемый в КЖ, образуется при дефосфорилировании нуклеотида АИКАР-Р, синтезированного *de novo*, а не является вторичным продуктом биосинтеза гистидина. Поскольку АИКАР-Р – это природный аналог AMP, а АИКАР – аналог аденозина, повышенное содержание этих соединений в клетках продуцента сопровождается, вероятно, множественными метаболическими эффектами (см. выше), значение кото-

рых для продукции AICAR далеко не ясно. В клетках микроорганизмов AICAR-P служит не только интермедиатом метаболизма пуринов, но и регуляторной молекулой общеклеточного значения. Превращение AICAR-P в IMP требует участия N10-формилтетрагидрофолата, поэтому повышенный уровень AICAR-P в клетках может сигнализировать о нарушении одноуглеродного метаболизма, что позволяло ранее считать этот нуклеотид сигналом тревоги (alarmone) [42]. Несмотря на то что прокариоты не имеют для AICAR-P мишени, подобной АМПК животных, направленность физиологического действия этого аналога АМР в них сохраняется. В частности, инактивация гена *purH* в *Salmonella enterica* и накопление в клетках AICAR-P приводит к подавлению активности фруктозо-1,6-бисфосфатфосфатазы, вследствие чего клетки теряют способность к глюконеогенезу и не растут на глицерине и других глюконеогенных субстратах [43]. В клетках прокариот и низших эукариот (например, дрожжей) некоторое количество AICAR-P образуется как побочный продукт биосинтеза гистидина, что создает дополнительные возможности регуляции биосинтеза пуриновых нуклеотидов [44]. Множественные и далеко не полностью изученные регуляторные связи AICAR-P осложняют конструирование штаммов-продуцентов и требуют дальнейшего изучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований на основе бактерий *B. subtilis* получен штамм-продуцент AICAR – нового препарата широкого терапевтического применения. Стратегия получения штамма-продуцента AICAR основана на направленной реконструкции пуринового метаболизма в клетках *B. subtilis*. На первом этапе работы в ген *purR*, кодирующий белок-репрессор *pur*-оперона, внесена инсерция, а также был удален терминатор транскрипции в лидерной области *pur*-оперона, что обеспечило максимальную дерепрессию ферментов биосинтеза пуринов *de novo*. Затем из генома бактерий удалили

ген *purH*, кодирующий формилтрансферазу/ИМР-циклогидролазу. Инактивация этого фермента нарушает реакцию превращения AICAR в IMP и приводит к его накоплению в клетке. На следующем этапе работы проведен сайт-направленный мутагенез генов *prs* и *purF* *E. coli*, кодирующих ключевые ферменты синтеза предшественников пуринов, с целью получения их мутантных вариантов, не подверженных ретроингибированию пуриновыми нуклеотидами. Наконец, на последнем этапе работы модифицированные гены *prs* и *purF* *E. coli* встроили в хромосому *B. subtilis* под контроль сильного промотора, обеспечивающего высокий уровень их экспрессии в клетках *B. subtilis*. В итоге получили штамм-продуцент, накапливающий 11–13 г/л AICAR в КЖ.

В заключение следует отметить, что совсем недавно появилось сообщение о том, что AICAR успешно прошел вторую стадию клинических испытаний в качестве противоопухолевого средства [45]. AICAR оказывает положительный эффект при хроническом лимфоцитарном лейкозе, множественной миеломе и мантийно-клеточной лимфоме. Важно подчеркнуть, что приведенная в каталогах стоимость коммерческих препаратов AICAR составляет от \$100 до \$1000 за грамм, что, по-видимому, обусловлено его получением путем химического синтеза. Высокая стоимость делает AICAR малодоступным для научно-исследовательской работы и тем более для терапии метаболического синдрома. Сконструированный нами штамм-продуцент AICAR может стать основой для разработки промышленного микробиологического производства общедоступного препарата AICAR, стоимость которого будет на порядки ниже по сравнению с указанными выше ценами. ●

Авторы выражают благодарность

Н.П. Закатаевой за предоставление плазмиды *pNZT1*, а также В.А. Муратовой и Г.И. Сергеевой за квалифицированную техническую помощь.

Работа выполнена при частичной поддержке Фонда некоммерческих программ «Династия».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Buchanan J.M., Hartman S.C. // Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 1959. V. 21. P. 199–261.
2. Zalkin H., Nygaard P. *Escherichia coli* and *Salmonella*. Washington, DC.: ASM Press, 1996. P. 561–579.
3. Switzer R.L., Zalkin H., Saxild H.H. *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells. Washington, DC.: ASM Press, 2002. P. 255–269.
4. Hardie D.G., Carling D., Carlson M. // Ann. Rev. Biochem. 1998. V. 67. P. 821–855.
5. Hardie D.G., Salt I.P., Hawley S.A., Davies S.P. // Biochem. J. 1999. V. 338. P. 717–722.
6. Rutter G.A., Xavier G.S., Leclerc I. // Biochem. J. 2003. V. 375. P. 1–16.
7. Gaidhu M.P., Fediuc S., Anthony N.M., So M., Mirpourian M., Ceddia R.B. // J. Lipid Res. 2009. V. 50. P. 704–715.
8. Swinnen J.V., Beckers A., Brusselmans K., Organe S., Segers J., Timmermans L., Vanderhoydonc F., Deboel L., Derua R., Waelkens E., et al. // Cancer Res. 2005. V. 65. P. 2441–2448.
9. Pold R., Jensen L.S., Jessen N., Buhl E.S., Schmitz O., Flyvbjerg A., Fujii N., Goodyear L.J., Gotfredsen C.F., Brand C.L., et al. // Diabetes. 2005. V. 54. P. 928–934.
10. Campas C., Lopez J.M., Santidrian A.F., Barragan M., Bellosillo B., Colomer D., Gil J. // Blood. 2003. V. 101. P. 3674–3680.

11. Sengupta T.K., Leclerc G.M., Hsieh-Kinzer T.T. // *Mol. Cancer*. 2007. V. 6. № 46. P. 1–12.
12. Matsuno K., Mori Y., Asahara T. // *US Patent* 7326546. 2008.
13. Asahara T., Mori Y., Zakataeva N.P., Livshits V.A., Yoshida K., Matsuno K. // *Appl. Microb. Biotechnol.* 2010. V. 87. P. 2195–2207.
14. Ebbole D.J., Zalkin H. // *J. Biol. Chem.* 1987. V. 262. P. 8274–8287.
15. Weng M., Nagy P.L., Zalkin H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995. V. 92. P. 7455–7459.
16. Ebbole D.J., Zalkin H. // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. P. 10894–10902.
17. Johansen L.E., Nygaard P., Lassen C., Agerso Y., Saxild H.H. // *J. Bacteriol.* 2003. V. 185. P. 5200–5209.
18. Mironov A.S., Gusarov I., Rafikov R., Lopez L.E., Shatalin K., Kreneva R.A., Perumov D.A., Nudler E. // *Cell*. 2002. V. 111. P. 747–756.
19. Nudler E., Mironov A.S. // *Trends Biochem. Sci.* 2004. V. 29. P. 11–17.
20. Mandal M., Boese B., Barrick J.E., Winkler W.C., Breaker R.R. // *Cell*. 2003. V. 113. P. 577–586.
21. Лобанов К.В., Королькова Н.В., Еремина С.Ю., Эрраис Лопес Л., Миронов А.С. // *Генетика*. 2011. Т. 47. № 7. С. 890–899.
22. Hove-Jensen B., Nygaard P. // *Eur. J. Biochem.* 1982. V. 126. P. 327–332.
23. Meyer E., Switzer R.L. // *J. Biol. Chem.* 1979. V. 254. P. 5397–5402.
24. Turnbough C.L., Switzer R.L. // *J. Bacteriol.* 1975. V. 121. P. 108–114.
25. Zhou G., Smith J.L., Zalkin H. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 6784–6789.16. C.L.
26. Anagnostopoulos C., Spizizen J. // *J. Bacteriol.* 1961. V. 81. P. 741–746.
27. Yoshikawa H., Sueoka N. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1963. V. 49. P. 559–566.
28. Christiansen L.C., Schou S., Nygaard P., Saxild H.H. // *J. Bacteriol.* 1997. V. 179. P. 2540–2550.
29. Blattner F.R., Plunkett G. 3rd., Bloch C.A., Perna N.T., Burland V., Riley M., Collado-Vides J., Glasner J.D., Rode C.K., Mayhew G.F., et al. // *Science*. 1997. V. 277. P. 1453–1474.
30. Zakataeva N.P., Nikitina O.V., Gronskiy S.V., Romanenkov D.V., Livshits V.A. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010. V. 85. P. 1201–1209.
31. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor. N.Y.; Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989.
32. Saito H., Miura K.I. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1963. V. 42. P. 619–629.
33. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1977. V. 74. P. 5463–5467.
34. Shatalin K.Y., Neyfakh A.A. // *FEMS Microbiol. Lett.* 2005. V. 245. P. 315–319.
35. Arnvig K., Hove-Jensen B., Switzer R.L. // *Eur. J. Biochem.* 1990. V. 192. P. 195–200.
36. Hove-Jensen B., Harlow K.W., King C.J., Switzer R.L. // *J. Biol. Chem.* 1986. V. 261. P. 6765–6771.
37. Henkin T.M. // *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics / Eds Sonenshein A.L., Hoch J.A., Losick R. Washington, D.C.: American Soci. Microbiol. 1993. P. 669–682.
38. Linder C., Nijland R., Hartkamp M. // *J. Bacteriol.* 2004. V. 186. P. 1097–1105.
39. Estrem S.T., Gaal T., Ross W. Gourse R.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. V. 95. P. 9761–9766.
40. Chen S., Tomchick D.R., Wolle D., Hu P., Smith J.L., Switzer R.L., Zalkin H. // *Biochemistry*. 1997. V. 36. P. 10718–10726.
41. Sheremet A.S., Gronskiy S.V., Akhmadyshin R.A., Novikova A.E., Livshits V.A., Shakulov R.S., Zakataeva N.P. // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2011. V. 38. P. 65–70.
42. Bochner B.R., Ames B.N. // *Cell*. 1982. V. 29. P. 929–937.
43. Dougherty M.J., Boyd J.M., Downs D.M. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 28. P. 33892–33899.
44. Rebora K., Laloo B., Daignan-Fornier B. // *Genetics*. 2005. V. 170. P. 61–70.
45. Пресс-релиз компании «Advancell» от 16.02.2011.

УДК 577.2

Структура димера трансмембранного домена гликофорина А в окружении липидов и детергентов

К. С. Минеев, Э. В. Бочаров*, П. Е. Волынский, М. В. Гончарук, Е. Н. Ткач, Я. С. Ермолюк, А. А. Шульга, В. В. Чупин, И. В. Масленников, Р. Г. Ефремов, А. С. Арсеньев

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

*E-mail: bon@nmr.ru

Поступила в редакцию 24.02.2011 г.

РЕФЕРАТ Специфические взаимодействия между трансмембранными α -спиралями во многом определяют биологическую функцию мембранных белков при нормальном развитии организма и в его патологических состояниях. Для изучения структурно-динамических особенностей, определяющих олигомеризацию трансмембранных α -спиралей, используют различные мембраноподобные среды, которые отчасти воспроизводят условия многокомпонентных биологических мембран. Состав мембраноподобной среды выбирают так, чтобы трансмембранный белковый комплекс имел биологически значимую конформацию, а стабильность образца позволяла проводить серию длительных экспериментов. В настоящей работе методами гетероядерной спектроскопии ЯМР и молекулярной динамики на примере димеризующегося трансмембранного домена битопного белка гликофорина А показано, что две широко используемые среды в виде детергентных мицелл ДФХ и липидных бицелл ДМФХ/ДФХ позволяют проводить структурно-динамические исследования специфических взаимодействий между трансмембранными α -спиралями. Однако ряд особенностей ставит липидные бицеллы ближе по своим характеристикам к природному липидному бислою.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА мембраноподобные среды, битопные мембранные белки, трансмембранный домен, димеризация, пространственная структура, молекулярная динамика, спектроскопия ЯМР.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ТМ – трансмембранный; GrAtm – фрагмент гликофорина А, GrA₆₁₋₉₈, содержащий ТМ-домен; ДФХ – додецилфосфохолин; ДМФХ – димиристоилфосфатидилхолин; ДГФХ – дигексаноилфосфатидилхолин; СКО – среднеквадратичное отклонение; ЯЭО – ядерный эффект Оверхаузера; NOESY – ЯМР-спектроскопия ЯЭО; HSQC – гетероядерная одноквантовая корреляция.

ВВЕДЕНИЕ

Мембранные белки, составляя более 25% протеома [1], обеспечивают уникальность биологической роли каждой клеточной мембраны и определяют ее физико-химические свойства. Важнейшие процессы в клетке, такие, как межклеточная рецепция и коммуникация, молекулярный и ионный транспорт, слияние мембран и т.д., непосредственно связаны с участием мембранных белков. Взаимодействие между трансмембранными (ТМ) доменами белков, способных олигомеризоваться в мембране, во многих случаях важно для проявления их активности. Так называемые битопные мембранные белки, имеющие только один ТМ α -спиральный сегмент, играют ключевую роль во многих биологических процессах в организме человека. Регуляция активности битопных белков в большинстве случаев сопряжена с гомо- или гетеродимеризацией в клеточной мембране при непосредственном участии их ТМ-доменов [2, 3]. К этому

классу белков принадлежит большая часть рецепторных протеинкиназ, иммунорецепторов и апоптозных белков, которые принимают непосредственное участие в управлении развитием и гомеостазом всех тканей организма как в норме, так и при патологических состояниях.

Для изучения физических параметров взаимодействия ТМ-доменов белков методом спектроскопии ЯМР в растворе необходимо поместить их в среду, имитирующую клеточную мембрану [4]. Для получения спектров ЯМР высокого качества необходимо, чтобы размер частиц такой среды был относительно небольшим, а стабильность образца позволяла проводить серию длительных экспериментов. В то же время очень важно подобрать адекватный состав мембраноподобной среды, в которой ТМ-белковый комплекс имеет биологически значимую конформацию. На настоящий момент широкое применение получили два класса сред, имитирующих мембранное

окружение – детергентные мицеллы, имеющие сферическую форму, и фосфолипидные бицеллы, которые, как полагают, имеют дисковидную форму [5].

В представленной работе методами гетероядерной спектроскопии ЯМР и молекулярной динамики впервые в мире проведено сравнительное исследование влияния разных мембраноподобных сред на конформацию димеризующегося ТМ-домена битопного белка. Гликофорин А (GrA) – антигенпредставляющий белок на поверхности эритроцитов человека – широко используется как модельный объект для отработки экспериментальных и теоретических методик изучения пространственной структуры и внутримолекулярной динамики взаимодействующих ТМ-доменов битопных белков. Именно для ТМ-домена GrA, солюбилизованного в мицеллах, была впервые установлена пространственная структура ТМ-димера, хотя до сих пор остались некоторые неопределенности в его строении [6–8]. Для оценки степени влияния мембраноподобного окружения на конформацию взаимодействующих ТМ α -спиралей в настоящей работе были исследованы структурно-динамические характеристики гомодимера ТМ-фрагмента GrA_{61–98} (GrAtm) в двух средах: детергентных мицеллах из додецилфосфохолина (ДФХ) и липидных бицеллах из смеси димиристоилфосфатидилхолина/дигексаноилфосфатидилхолина (ДМФХ/ДГФХ).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение ЯМР-образцов рекомбинантного ТМ-фрагмента GrA_{61–98} (GrAtm) в мембраноподобных средах

Рекомбинантный пептид, соответствующий фрагменту R⁶¹VQLANHFSEPEITLIIFGV⁹⁸MAGVIGTILLISYGI⁹⁸RL GrA человека (GrAtm), включающий ТМ-домен (подчеркнут), был получен по методу [9, 10]. Для проведения ЯМР-исследований в качестве мембраноподобных сред использовали детергентные мицеллы ДФХ и небольшие бицеллы ДМФХ/ДГФХ с молярным соотношением липидов 1 : 4. Использовали полностью дейтерированный детергент d_{38} -ДФХ (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, США), а также липиды d_{54} -ДМФХ и d_{22} -ДГФХ с дейтерированными ацильными цепями, синтезированными как описано в [11]. Сухие порошки белка и детергента или липидов растворяли в смеси трифторэтанол–вода 1 : 1 (v/v), а затем лиофилизировали. Сухой порошок растворяли в буфере, содержащем дейтерированный ацетат натрия (20 мМ, рН 5.0, 5% D₂O), EDTA (1 мМ) и азид натрия (0.05 мМ), и проводили по пять циклов замораживания-нагрева (до ~ 40°C) с последующим озвучиванием в течение нескольких минут в ультразвуковой бане до полной

прозрачности раствора. Все образцы готовили из расчета 2 мМ GrAtm в 0.5 мл раствора мицелл или бицелл с молярным соотношением пептид/детергент или липиды приблизительно 1 : 35, что обеспечивает содержание примерно двух молекул ТМ-пептида на мицеллу/бицеллу (при этом с учетом критической концентрации мицеллообразования липидов эффективное соотношение количества длинных и коротких липидов в бицелле $q \approx 0.3$). В обеих мембраноподобных средах были приготовлены по три образца димера GrAtm с использованием только ¹⁵N-меченного или ¹⁵N/¹³C-меченного ТМ-пептида, а также смеси 1 : 1 из ¹⁵N/¹³C-меченного и немеченного ТМ-пептида («изотопно-гетеродимерный» образец).

Размер мицелл и бицелл со встроенным GrAtm, а также его вторичную структуру контролировали с помощью оптических методов – динамического светорассеяния и кругового дихроизма. Эксперименты по динамическому светорассеянию проводили на установке DynaPro Titan (Wyatt Technology Corporation, США) в 12 мкл кювете при температуре 30°C. Спектры кругового дихроизма для GrAtm, встроенного в мицеллы, бицеллы или липосомы (фосфолипидный бислой), получали на спектрополяриметре J-810 (Jasco, Япония) в 0.1 мм кварцевой кювете при температуре 30°C и концентрации пептида 1 мг/мл. Спектры кругового дихроизма анализировали с использованием программы CDSSTTR [12]. Для приготовления небольших однослойных везикул суспензию липосом из ДМФХ при соотношении пептид/липид 1 : 50 обрабатывали ультразвуком во льду при помощи ультразвукового дезинтегратора с титановым наконечником (VirSonic-600, США) до полной прозрачности образца (примерно 10 мин).

ЯМР-спектроскопия, расчет и релаксация пространственной структуры димера ТМ-фрагмента GrA_{61–98}, солюбилизованного в мембраноподобных средах

ЯМР-спектры GrAtm, солюбилизованного в мицеллах ДФХ и бицеллах ДМФХ/ДГФХ при рН 5.0 и 40°C, получены на спектрометрах UNITY (Varian, Palo Alto, CA, США) и AVANCE-III (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Германия) с рабочими частотами на протонах 600 МГц. Анализ ЯМР-спектров проводили с использованием программы SARA [13]. Отнесения ¹H-, ¹³C- и ¹⁵N-резонансов пептида и получение структурной информации проводили по стандартной методике с использованием экспериментов тройного резонанса [14, 15]. Информация о внутримолекулярной динамике ТМ-пептида получена на основе анализа ¹⁵N-релаксационных данных: значений гетероядерного ¹⁵N{¹H} ЯЭО, времен продольной (T_1) и поперечной (T_2) релаксации, а также эффективных

времен вращательной корреляции (τ_R), измеренных по методике, описанной в [16]. Скорости обмена амидных протонов на дейтерий растворителя оценены из изменения интенсивностей сигналов в наборе спектров $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC, последовательно накопленных в течение суток для растворенных в D_2O образцов GrAtm, предварительно встроенных в мицеллы или бицеллы и лиофилизированных.

Расчет пространственной структуры осуществлен по стандартной методике [14] в программе CYANA 3.0 [17] с использованием метода молекулярной динамики в пространстве двугранных углов и алгоритма «моделируемого отжига» (simulated annealing). Ограничения на межпротонные внутримonomерные расстояния получены из объемов кросс-пиков ЯЭО в спектрах $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC и $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -NOESY-HSQC, накопленных со временем смешивания $t_m = 80$ мс. Межmonomерные контакты ЯЭО на интерфейсе димеризации GrAtm получены из спектра 3D $^1\text{H}/^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -F1-filtered/F3-separated-NOESY-HSQC ($t_m = 80$ мс) с использованием «изотопно-гетеродимерного» образца [15]. Диапазоны двугранных углов ϕ , ψ и χ^1 основной цепи белков оценивали из значений ^1H , ^{15}N и ^{13}C химических сдвигов NH-, C α H- и CO-групп GrAtm в программе TALOS [18]. Ограничения на водородные связи добавлены после предварительного расчета структуры на основе анализа данных по скоростям обмена амидных протонов на дейтерий растворителя и пространственной близости амидных протонов и атомов кислорода основной цепи GrAtm в предварительном наборе структур. Были введены следующие ограничения: для углов $140^\circ < \text{NHO} < 180^\circ$ и $130^\circ < \text{COH} < 170^\circ$ и расстояний $1.9 \text{ \AA} \leq d(\text{O}, \text{H}^{\text{N}}) \leq 2.3 \text{ \AA}$, $3.0 \text{ \AA} \leq d(\text{O}, \text{N}) \leq 3.4 \text{ \AA}$, $3.2 \text{ \AA} \leq d(\text{C}, \text{H}^{\text{N}}) \leq 3.6 \text{ \AA}$ [19]. В результате на основе верхних ограничений на межпротонные расстояния (с учетом стереоспецифического отнесения групп пептида), а также ограничений на двугранные углы ϕ , ψ и χ^1 и на водородные связи рассчитаны наборы из 200 структур для GrAtm, встроенного в мицеллы или бицеллы. Из этих наборов в качестве репрезентативных были выбраны по 20 структур с наименьшими значениями штрафной функции.

Энергетическую релаксацию репрезентативных ЯМР-структур димера GrAtm проводили соответственно в явно заданных гидратированных мицеллах ДФХ (60 молекул) или бислое ДМФХ (512 молекул) методом молекулярной динамики (МД) с использованием программного пакета GROMACS 3.3.1 [20] как подробно описано в [21]. После уравнивания и минимизации энергии системы рассчитывали траектории МД длительностью 2 нс с фиксированным положением атомов димера GrAtm, затем 10 нс с экспериментальными ЯМР-ограничениями на рас-

стояния и, наконец (для оценки стабильности системы), 10 нс без каких-либо ограничений.

Для анализа и визуализации пространственных структур использовали программы CYANA 3.0, MOLMOL [22] и RYMO [23]. Гидрофобные свойства поверхности α -спиралей рассчитывали с использованием подхода молекулярного гидрофобного потенциала (МГП) [24]. Площадь контакта между α -спиралями рассчитывали с использованием программы DSSP [25] как разность площадей доступной растворителю поверхности остатков GrAtm в monomерном и димерном состояниях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Пространственная структура и внутримолекулярная подвижность димера GrAtm

Влияние мембраноподобного окружения на взаимодействия спиралей в гомодимере GrAtm исследовано на примере двух сред, часто используемых в ЯМР-спектроскопии мембранных белков (рис. 1а,б): сферических мицеллах ДФХ и дискообразных липидных бицеллах ДМФХ/ДГФХ ($\varrho \approx 0.3$) [4, 5]. Для исключения возможных разночтений, связанных с различными методиками сбора экспериментальных ЯМР-данных и расчета пространственной структуры, полученная ранее пространственная структура ТМ-фрагмента GrA₆₂₋₁₀₁ в мицеллах ДФХ [6] в данной работе не рассматривается.

Спектры кругового дихроизма для фрагмента GrAtm, встроенного как в мицеллы ДФХ или бицеллы ДМФХ/ДГФХ, так и в однослойные липосомы ДМФХ (фосфолипидный бислой), оказались практически идентичными и соответствовали $75 \pm 8\%$ содержанию α -спирали. Параметры ЯМР-релаксации ^{15}N -ядер основной цепи GrAtm: $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ NOE, времена T_1 и T_2 , а также рассчитанные эффективные локальные времена вращательной корреляции τ_R векторов ^{15}N -H (рис. 2) доказывают наличие стабильного ТМ-сегмента E⁷⁰-R⁹⁶, фланкируемого гибкими N- и C-концевыми участками. Время корреляции вращения комплекса пептид/мицелла или бицелла как целого, оцененное из отношения T_1/T_2 на ТМ-участке, составляет ~ 13 и ~ 16 нс, что, согласно эмпирической зависимости [26], соответствует димеру GrAtm, образующему комплекс с ~ 65 молекулами детергента (~ 34 кДа) или ~ 70 молекулами липида (~ 43 кДа). При этом, согласно данным динамического светорассеяния, обе супрамолекулярные системы имеют сходный гидродинамический радиус $26 \pm 4 \text{ \AA}$.

Чтобы получить информацию о взаимодействиях между спиралью GrAtm, использовали спектр ЯМР, накопленный для «изотопно-гетеродимерного» образца (рис. 1в). В этом спектре представлены

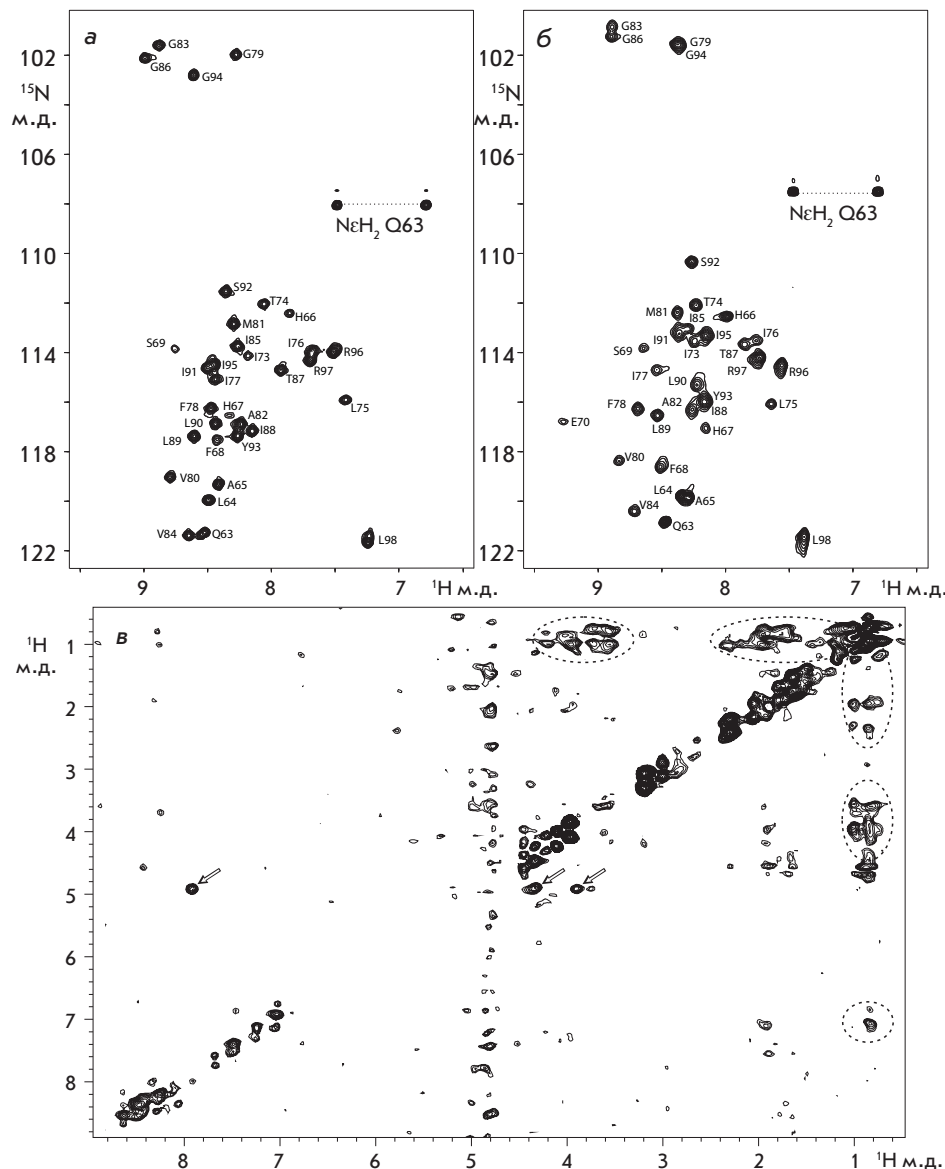


Рис. 1. Гетероядерные ЯМР-спектры $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC GrA tm в водной суспензии мицелл ДФХ (а) и бицелл ДМФХ/ДГФХ (б) с молярным отношением пептид/детергент и пептид/липид 1 : 35, рН 5, 40°C. Приведено отнесение сигналов. в – ^1H - ^1H -проекция 3D $^1\text{H}/^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -F1-filtered/F3-edited-NOESY-спектра с межмономерными контактами ЯЭО для «изотопно-гетеродимерного» образца GrA tm в мицеллах ДФХ. Наблюдаемые в спектре кросс-пики соответствуют отфильтрованным межмономерным протон-протонным контактам ЯЭО. Пунктирными овалами обозначены области с межмономерными контактами ЯЭО между метильными и остальными группами остатков димера GrA tm. Стрелками указаны неотфильтрованные внутримномерные контакты ЯЭО с участием гидроксильной группы ОуН остатка Т⁸⁷. Эти контакты свидетельствуют о том, что в основной конформации ОуН-группа Т⁸⁷ образует внутримолекулярную связь с карбоксильной группой G⁸³.

кросс-пики ЯЭО, соответствующие переносу намагниченности от протонов, связанных с атомами ^{14}N и ^{12}C , на протоны, связанные атомами ^{15}N и ^{13}C [15]. В результате обнаружено 17 межмономерных ЯЭО-контактов в мицеллах и 14 в бицеллах. Наборы внутри- и межмономерных ЯЭО-контактов, идентифицированных в ЯМР-спектрах, показали, что в обеих средах GrA tm формирует симметричный в шкале времени ЯМР гомодимер, состоящий из двух параллельных спиралей. Следует отметить, что большинство различий в системах ЯЭО-контактов, наблюдаемых для GrA tm в мицеллах и бицеллах, можно объяснить изменениями химических сдвигов сигналов и связанными с этим различиями в перекрытиях кросс-пигов. Пространственные структуры

GrA tm определены с высоким качеством и разрешением (таблица, рис. 3а). Экспериментальные ЯМР-ограничения, использованные для расчета пространственных структур, и полученные координаты атомов для наборов структур димера GrA tm, встроенного в мицеллы ДФХ и бицеллы ДМФХ/ДГФХ, депонированы в международном банке данных пространственных структур RCSB (www.rcsb.org) с кодами доступа 2kre и 2krf соответственно. Репрезентативные структуры димера GrA tm подвергнуты энергетической МД-релаксации в явно заданной мицелле ДФХ и липидном бислое ДМФХ с наложенными экспериментальными ограничениями на расстояния. Это позволило адаптировать ЯМР-структуру к модельному мембранному окружению (рис. 3в) и про-

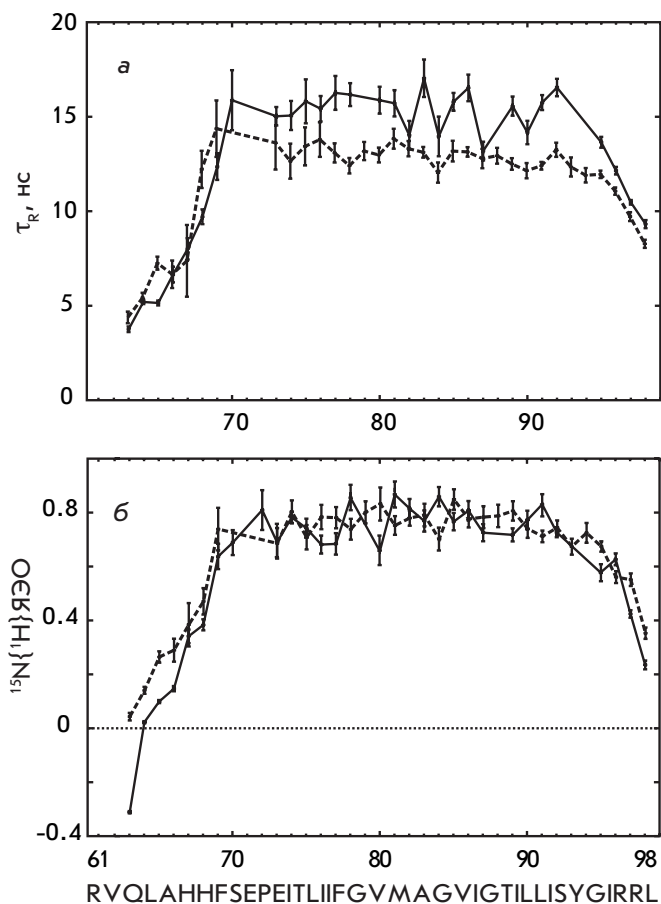


Рис. 2. ^{15}N -релаксационные параметры для амидных групп GrA в мицеллах ДФХ (пунктирная линия) и бицеллах ДМФХ/ДГФХ (сплошная линия). а – Значения эффективного времени корреляции броуновского вращения τ_R , рассчитанного из отношения времен T_1/T_2 ^{15}N -ядер соответствующих аминокислотных остатков; б – значения гетероядерного $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ ЯЭО.

верить используемые в МД-расчете силовые поля на соответствие результатам эксперимента. В обоих случаях продолжение МД-траектории без ограничений не вызвало существенных изменений структуры димера, что указывает как на его относительную стабильность, так и на приемлемость используемых силовых полей.

В целом, пространственная структура и внутри-молекулярная подвижность ТМ-домена GrA в мицеллах и бицеллах отличаются незначительно: в обоих случаях оси трансмембранных α -спиралей расположены под углом θ , равным -40° , а расстояние d между ними составило около 6.5 \AA . Вместе с тем сравнение пространственных структур димера (рис. 3а) показывает, что при переходе от мицелл

к бицеллам происходит небольшой изгиб на С-конце ТМ-спиралей. Периодический характер изменений химических сдвигов сигналов амидных протонов, $\Delta\delta_{\text{HN}}$, вдоль аминокислотной последовательности GrA при переходе от мицелл к бицеллам также указывает на небольшой изгиб на С-конце спиралей (рис. 3б). Тенденция изменения средних значений $\Delta\delta_{\text{HN}}$ от отрицательных к положительным вдоль ТМ-спирали указывает на возможное небольшое растяжение ее N-концевой части до интерфейса димеризации и сжатие после. Небольшой изгиб С-концов ТМ-спиралей, наряду с общим наклоном димера GrA по отношению к нормали липидного бислоя ДМФХ, также наблюдали в течение МД-релаксации (рис. 3в). Напротив, существенных искривлений ТМ-спиралей в димере GrA, встроенном в мицеллу ДФХ, не регистрировали ни в наборе рассчитанных структур, ни в течение МД-релаксации. Так как ацильные цепи в ДФХ короче (образованы 12 атомами углерода), чем в ДМФХ (14 углеродных атомов), то можно было бы ожидать более длинную ТМ-спираль (например, за счет частичного перехода α -спирали в спираль 3/10) в бицеллах по сравнению с мицеллами. Однако в полученном наборе ЯМР-структур димера GrA в мицеллах и бицеллах разница в длине α -спирального участка не обнаружена. И только во время МД-релаксации в явно заданной мицелле для первого витка ТМ-спирали GrA изредка наблюдали переходы спираль-изгиб (рис. 3в). Это согласуется с тем, что мицеллы являются более пластичными структурами, чем бицеллы, и в большей степени способны адаптироваться к форме и размерам ТМ-белка [27, 28]. В свою очередь, мицеллы по сравнению с бицеллами могут предоставлять большую свободу конформационной динамики для встроенного в них ТМ-белка. Действительно, во время МД-релаксации GrA без наложения ЯМР-ограничений параметры димера характеризовались в 2 раза большими амплитудами случайных флуктуаций в мицеллах ДФХ ($\theta 46 \pm 6^\circ$, $d 6.3 \pm 0.8 \text{ \AA}$), чем в бислое ДМФХ ($\theta 42 \pm 3^\circ$, $d 6.4 \pm 0.4 \text{ \AA}$), что указывает на более плотную упаковку ТМ-спиралей димера в липидном окружении. По-видимому, изменения в пространственной структуре димера GrA, наблюдаемые методом ЯМР в бицеллах по сравнению с мицеллами и в течение его МД-релаксации в липидном бислое, обусловлены адаптацией димера к бислою ДМФХ для предотвращения так называемого «гидрофобного несоответствия» [29, 30].

Поверхность димеризации GrA

Спирали GrA, встроенные в мицеллу ДФХ или в бицеллу ДМФХ/ДГФХ, ассоциируют в параллельный димер через так называемый тандемный

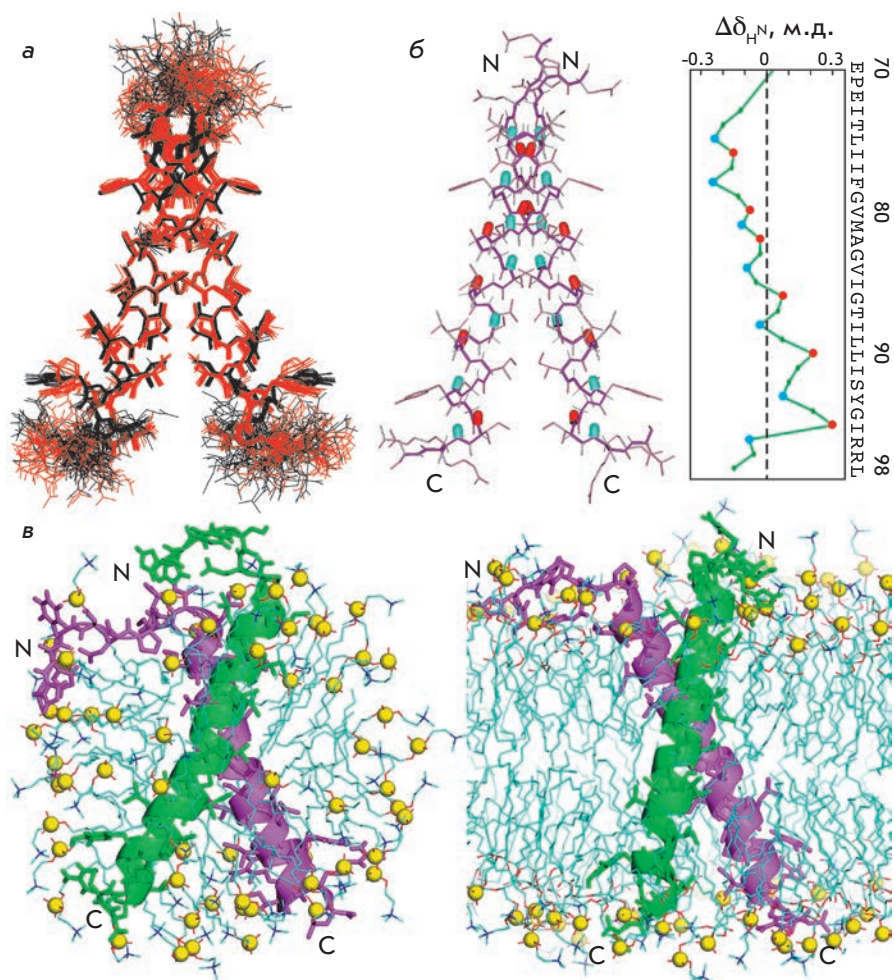


Рис. 3. а – Сравнение ЯМР-структур димера GrA tm в бицеллах ДМФХ/ДГФХ (показаны красным) и в мицеллах ДФХ (показаны черным). 20 структур в бицеллах и 20 структур в мицеллах совмещены по атомам основной цепи α-спирали E⁷²–I⁹⁵. Показаны только ковалентные связи с участием тяжелых атомов остатков (70–98). б – Справа показана разница (Δδ_{HN}) химических сдвигов сигналов протонов амидных групп GrA tm в бицеллах ДМФХ/ДГФХ и мицеллах ДФХ. Слева на структуре димера GrA tm в бицеллах голубым и красным выделены амидные группы остатков с локальными минимумами и максимумами значений Δδ_{HN} соответственно. Значение Δδ_{HN} сильно зависит от длины водородной связи, в которой участвует данный амидный протон, при этом локальное увеличение Δδ_{HN} указывает на укорочение водородной связи [37]. в – Структуры димера GrA tm после МД-релаксации в явно заданной мицелле ДФХ (слева) и бислое ДМФХ (справа). Желтыми сферами показаны атомы фосфора молекул детергентов и липидов. Ацильные цепи липидов и детергентов показаны голубыми линиями. Для наглядности разные мономеры окрашены в зеленый и лиловый цвета.

«четырёхчленный» мотив GG4 [31] G⁷⁹VxxG⁸³VxxT⁸⁷, также известный как «глициновая застёжка» [32]. Мотив образован остатками с малой боковой цепью, что даёт возможность получить плотную правозакрученную упаковку ТМ-спиралей GrA tm, контактирующих слабополярными поверхностями (рис. 4а,б) в гидрофобном окружении. В то же время предсказанный ранее методом молекулярного моделирования [33] альтернативный «семичленный» мотив LI⁷⁶xxG⁷⁹xxAG⁸³xxG⁸⁶xxLL⁹⁰xxY⁹³ с левозакрученной упаковкой ТМ α-спиралей не задействован.

В обеих средах на интерфейсе димеризации GrA tm имеются восемь полярных межмолекулярных взаимодействий типа Сα–Н…О. Эти взаимодействия, которые можно охарактеризовать как неканонические водородные связи (с соответствующим расстоянием d(O, H) < 3 Å и углом СОН > 120° [34]), образуются между СαН G⁷⁹, G⁸³, V⁸⁰ и V⁸⁴ и карбонильными группами I⁷⁶, G⁷⁹ и V⁸⁰, а также ОγН-группой T⁸⁷ соответственно (рис. 4в). Квантово-химические расчеты показали, что при-

сутствие взаимодействий такого типа должно приводить к существенному изменению химических сдвигов сигналов протонов СαН-групп белков [35]. То есть химические сдвиги сигналов протонов СαН являются очень чувствительным сенсором расстояний до карбонильных групп на интерфейсе димеризации α-спиралей. Химические сдвиги протонов СαН G⁷⁹, G⁸³, V⁸⁰ и V⁸⁴ практически полностью совпадают в мицеллах и бицеллах (максимальное отличие – 0.05 м.д.), что демонстрирует высокую степень идентичности структурной организации интерфейса димеризации GrA tm в двух средах. Другими словами, не только общая топология, но и структурные детали интерфейса димеризации GrA tm идентичны в обеих мембраноподобных средах.

Сравнение полученных и ранее опубликованных структур GrA tm

Структуры, полученные в рамках нашей работы, хорошо согласуются с опубликованными данными по мутагенезу [31]. С другой стороны, структура

Структурная статистика для репрезентативных наборов из 20 ЯМР-структур димера GrAtm, встроенного в мицеллы ДФХ и бицеллы ДМФХ/ДФХ

ЯМР-структура димера GrAtm	Мицеллы	Бицеллы
PDB-код	2kre	2kpf
ЯМР-данные для расчета структуры		
Общее количество ограничений ЯЭО	484	520
внутриостаточные	234	278
межостаточные	216	214
последовательные ($ i-j =1$)	128	128
средней дальности ($1 < i-j \leq 4$)	88	86
дальние ($ i-j > 4$)	0	0
межмономерные	34	28
Ограничения на водородные связи внутримономерные (верхние/нижние) межмономерные (верхние/нижние)	108/108 0/0	108/108 0/0
Ограничения на двугранные углы	156	156
угол ϕ основной цепи	56	56
угол ψ основной цепи	56	56
угол χ^1 боковой цепи	44	44
Качество расчета структуры		
Штрафная функция (\AA^2)	0.75±0.15	1.02±0.16
Нарушения ограничений		
на расстояния ($>0.2 \text{\AA}$)	0	0
на расстояния ($>0.1 \text{\AA}$)	6	5
на двугранные углы ($>5^\circ$)	0	0
Попарное СКО между структурами (\AA)		
ТМ α -спираль (72–95) ₂		
по атомам основной цепи	0.39±0.17	0.42±0.13
по всем тяжелым атомам	0.94±0.18	1.07±0.15
обобщенное СКО		
по атомам основной цепи	0.72±0.45	
по всем тяжелым атомам	1.25±0.37	
по атомам основной цепи между усредненными структурами	1.03	
Анализ карты Рамачандрана, % остатков (70–98) ₂		
в благоприятных регионах	92.7	90.4
в дополнительных разрешенных регионах	7.7	6.4
в принципиально разрешенных регионах	1.4*	0.2*
в запрещенных регионах	0.4*	0.7*
Упаковка ТМ-спиралей		
площадь межспиральных контактов (\AA^2)	370±20	380±20
угол θ (град) между осями ТМ-спиралей	-40±2	-40±2
расстояние d (\AA) между осями ТМ-спиралей	6.7±0.4	6.4±0.4

*Остатки из подвижных и неструктурированных участков GrAtm.

GrAtm как в мицелле, так и в бицелле оказалась близкой (СКО ~ 1.1 \AA по координатам атомов основной цепи остатков (72–95)₂) к ранее опубликованной структуре ТМ-фрагмента GrA₆₂₋₁₀₁, встроенного в мицеллу ДФХ [6]. Позднее на основе структурных ограничений, полученных методами ЯМР твердого тела, была предложена конформация димерного

ТМ-фрагмента GrA₇₀₋₉₈ в высушенных липидных бислоях из ДМФХ и пальмитоилолеилфосфатидилохолина (ПОФХ) [7, 8]. Помимо небольшого уменьшения угла между осями ТМ-спиралей до -35° и относительного их поворота в димере на $\sim 25^\circ$, главным отличием от структуры в мицелле ДФХ является характер водородной связи, образуемой боковой це-

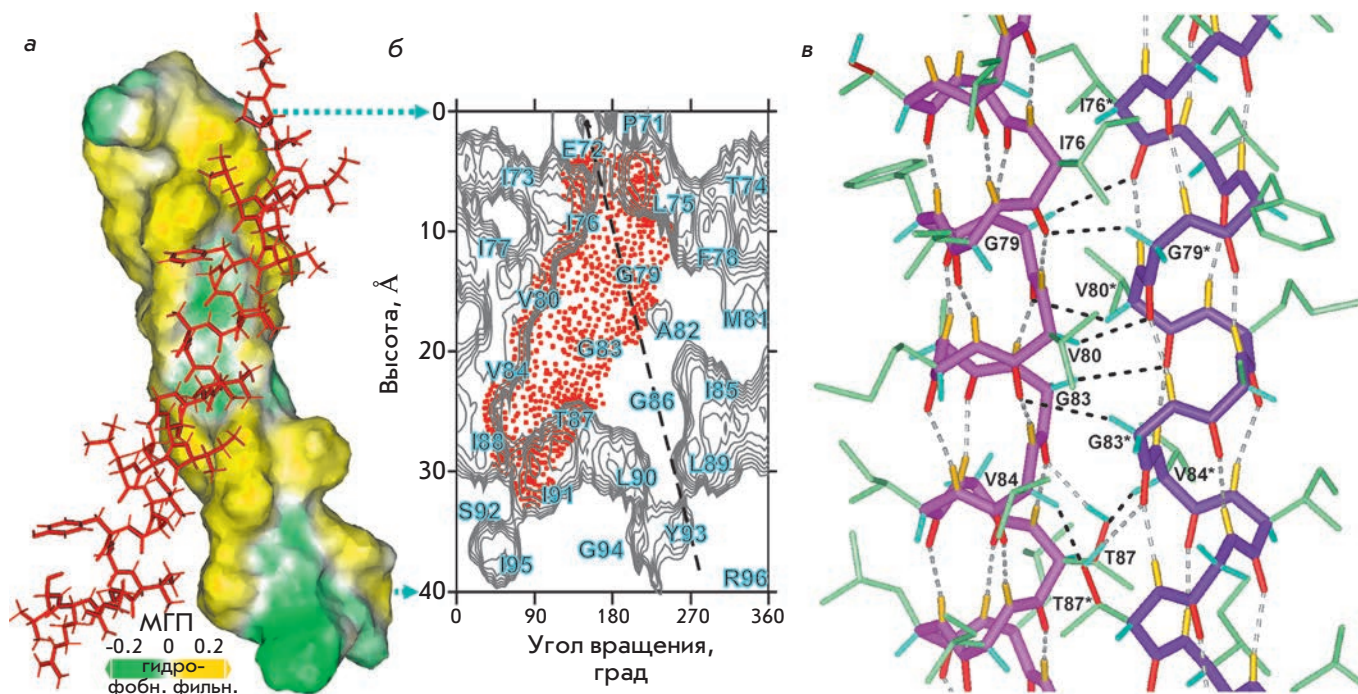


Рис. 4. а – Поверхность ТМ α -спирали правозакрученного димера GrA_{tm}, раскрашенная соответственно значениям молекулярного гидрофобного потенциала (МГП): желтым – гидрофобные, зеленым – гидрофильные участки. Второй мономер димера показан красным цветом. б – Карта поверхности ТМ α -спирали GrA_{tm} с изолиниями, соответствующими (гидрофобным) положительным значениям молекулярного гидрофобного потенциала (детали построения карты описаны в [21]). Красными точками отмечена область межмолекулярного контакта α -спиралей GrA_{tm}. Как видно из рисунка, контакт обеспечивается «четырёхчленным» GG4-подобным мотивом $G^{79}VxxG^{83}VxxT^{87}$. «Семичленный» мотив $L^{176}xxG^{79}xxAG^{83}xxG^{86}xxLL^{90}xxY^{93}$, предполагающий левозакрученную упаковку α -спиралей (отмечен штриховой линией), не задействован. в – Центральная часть интерфейса димеризации GrA_{tm} в бицеллах. Серым и черным пунктиром показаны внутримонмерные и неканонические α -N \cdots O межмономерные водородные связи соответственно.

пью T⁸⁷. На основании сближенности O_уH-группы треонина с карбонильной группой V⁸⁴ противоположной спирали авторы работы [8] сделали вывод о межмолекулярном характере этой связи. Согласно полученным в настоящей работе структурам димера GrA_{tm}, встроенного в мицеллы и бицеллы, атомы кислорода гидроксильной и карбонильной групп остатков T⁸⁷ и V⁸⁴ из соседних мономеров находятся на расстоянии ~4 Å, при этом в бицеллах эти атомы сближены до ~3.8 Å, что в принципе позволяет этим группам образовывать межмолекулярную водородную связь. Однако система контактов ЯЭО, наблюдаемая в спектрах ЯМР, измеренных как в бицеллах, так и в мицеллах (рис. 1в), однозначно свидетельствует о том, что в основной конформации GrA_{tm} O_уH-группа T⁸⁷ образует внутримолекулярную связь с карбонильной группой G⁸³ (сближены до ~2 Å) (рис. 4в). Тем не менее, во время МД-релаксации в обоих случаях детектировались несимметричные короткоживущие состояния

с межмолекулярной водородной связью между O_уH-группами T⁸⁷ (с поворотом угла χ^1 боковой цепи T⁸⁷ из *gauche+* в *gauche-* положение). Подобное явление было зарегистрировано и в других работах по моделированию димеризации ТМ-домена GrA [33, 36].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые для специфически взаимодействующих ТМ-спиралей проведено сравнительное исследование пространственной структуры и динамики в двух мембраноподобных средах разного вида. Это важный методический момент, позволяющий сделать вывод, что в случае ТМ-домена GrA общая топология димера, определяемая спецификой спираль-спирального взаимодействия, не зависит от выбора мембраноподобной среды и только локальная структура ТМ-спиралей в какой-то степени чувствительна к этому фактору. С другой стороны, известно, что дисковидная форма и липидный состав бицелл приближают их по физическим свойствам к при-

родной липидной мембране, в результате уменьшаются как конформационные флуктуации спиралей, так и флуктуации параметров, характеризующих их относительное расположение (угол θ и расстояние d между спиральями). В свою очередь, при прочих равных условиях это должно повышать стабильность пространственной структуры α -спирального мембранного белка в бицеллах по сравнению с мицеллами. ●

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований, Федеральной целевой программой «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы» и Программами Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и «Основы фундаментальных исследований нанотехнологий и наноматериалов».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Frishman D., Mewes H.-W. // Prog. Biophys. Mol. Biol. 1999. V. 72. P. 1–17.
- Li E., Hristova K. // Biochemistry. 2006. V. 45. P. 6241–6251.
- Zviling M., Kochva U., Arkin I.T. // Biochim. Biophys. Acta. 2007. V. 1768. P. 387–392.
- Bocharov E.V., Volynsky P.E., Pavlov K.V., Efremov R.G., Arseniev A.S. // Cell Adh. Migr. 2010. V. 4. P. 284–298.
- 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.
- MacKenzie K.R., Prestegard J.H., Engelman D.M. // Science. 1997. V. 276. P. 131–133.
- Smith S.O., Song D., Shekar S., Groesbeek M., Ziliox M., Aimoto S. // Biochemistry. 2001. V. 40. P. 6553–6558.
- Smith S.O., Eilers M., Song D., Crocker E., Ying W., Groesbeek M., Metz G., Ziliox M., Aimoto S. // Biophys. J. 2002. V. 82. P. 2476–2486.
- Гончарук М.В., Шульга А.А., Ермолюк Я.С., Ткач Е.Н., Гончарук С.А., Пустовалова Ю.Е., Минеев К.С., Бочаров Э.В., Масленников И.В., Арсеньев А.С., Кирпичников М.П. // Мол. биол. 2011. Т. 45. № 5.
- Кирпичников М.П., Гончарук М.В., Ермолюк Я.С., Гончарук С.А., Шульга А.А., Масленников И.В., Арсеньев А.С. // Технол. живых систем. 2005. Т. 2. С. 20–27.
- Chakrabarti P., Khorana G. // Biochemistry. 1975. V. 14. P. 5021–5033.
- Sreerama N., Woody R.W. // Anal. Biochem. 2000. V. 287. P. 252–260.
- Keller R.L.J. The computer aided resonance assignment tutorial. Goldau, Switzerland: CANTINA Verlag, 2004. 81 p.
- Cavanagh J., Fairbrother W.J., Palmer A.G., Skelton N.J. Protein NMR spectroscopy: principles and practice. 2nd ed. San Diego, CA, USA: Acad. Press, 2007. 886 p.
- Zwahlen C., Legault P., Vincent S.J.F., Greenblatt J., Konrat R., Kay L.E. // Am. Chem. Soc. 1997. V. 119. P. 6711–6721.
- Bocharov E.V., Korzhnev D.M., Blommers M.J., Arvinte T., Orekhov V.Y., Billeter M., Arseniev A.S. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 46273–46279.
- Güntert P. // Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. 2003. V. 43. P. 105–125.
- Cornilescu G., Delaglio F., Bax A. // J. Biomol. NMR. 1999. V. 13. P. 289–302.
- Baker E.N., Hubbard R.E. // Prog. Biophys. Mol. Biol. 1984. V. 44. P. 97–179.
- Lindahl E., Hess B., van der Spoel D. // J. Mol. Mod. 2001. V. 7. P. 306–317.
- Bocharov E.V., Mayzel M.L., Volynsky P.E., Mineev K.S., Tkach E.N., Ermolyuk Ya.S., Schulga A.A., Efremov R.G., Arseniev A.S. // Biophys. J. 2010. V. 98. P. 881–889.
- Koradi R., Billeter M., Wüthrich K.J. // Mol. Graphics. 1996. V. 14. P. 51–55.
- DeLano W.L. The PyMOL Molecular Graphics System, Palo Alto, CA, USA: DeLano Scientific, 2002.
- Efremov R.G., Gulyaev D.I., Vergoten G., Modyanov N.N. // J. Prot. Chem. 1992. V. 11. P. 665–675.
- Kabsch W., Sander C. // Biopolymers. 1983. V. 22. P. 2577–2637.
- Daragan V.A., Mayo K.H. // Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. 1997. V. 31. P. 63–105.
- Bordag N., Keller S. // Chem. Phys. Lipids. 2010. V. 163. P. 1–26.
- Lind J., Nordin J., Mäler L. // Biochim. Biophys. Acta. 2008. V. 1778. P. 2526–2534.
- Nyholm T.K., Ozdirekcan S., Killian J.A. // Biochemistry. 2007. V. 46. P. 1457–1465.
- Sparr E., Ash W.L., Nazarov P.V., Rijkers D.T., Hemminga M.A., Tieleman D.P., Killian J.A. // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. P. 39324–39331.
- Mackenzie K.R. // Chem. Rev. 2006. V. 106. P. 1931–1977.
- Kim S., Jeon T.-J., Oberai A., Yang D., Schmidt J.J., Bowie J.U. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. P. 14279–14283.
- Efremov R.G., Vereshaga Y.A., Volynsky P.E., Nolde D.E., Arseniev A.S. // J. Comput. Aided. Mol. Des. 2006. V. 20. P. 27–45.
- Senes A., Ubarretxena-Belandia I., Engelman D.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. P. 9056–9061.
- Vargas R., Garza J., Dixon D.A., Hay B.P. // J. Am. Chem. Soc. 2000. V. 122. P. 4750–4755.
- Cuthbertson J.M., Bond P.J., Sansom M.S. // Biochemistry. 2006. V. 45. P. 14298–14310.
- Wagner G., Pardi A., Wüthrich K. // J. Am. Chem. Soc. 1983. V. 105. P. 5948–5949.

УДК 616.314.17-002-07:616.31-022

Соотношение патогенных представителей микробиоценоза пародонтальных карманов при пародонтите разной степени тяжести

О. А. Зорина^{1*}, А. А. Кулаков¹, О. А. Борискина¹, Д. В. Ребриков^{2,3}¹ФГУ ЦНИИС и ЧЛХ Минздравсоцразвития России, 119034, Москва, ул. Тимура Фрунзе, 16²Учреждение Российской академии наук Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991, Москва, ул. Губкина, 3³ЗАО «НПФ ДНК-Технология», 115478, Москва, Каширское ш., 24, корп. 2

*E-mail: zorina-cniis@yandex.ru

Поступила в редакцию 09.02.2011 г.

РЕФЕРАТ Широко распространенное заболевание – пародонтит – считается одним из проявлений нарушения соотношения нормальной и условно-патогенной микрофлоры пародонтального кармана. В представленной работе методом количественной ПЦР в реальном времени определено соотношение шести наиболее важных пародонтопатогенов и суммарной микрофлоры пародонтального кармана в группах здоровых индивидов и у лиц с пародонтитом разной степени тяжести. Установлено, что по мере развития пародонтита в суммарной микрофлоре пародонтального кармана устойчиво увеличивается относительное содержание *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* и *Tannerella forsythensis* (*Bacteroides forsythus*) и при тяжелой степени хронического генерализованного пародонтита более чем на два порядка превышает значения в контрольной группе.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА экосистема, биотоп, пародонтит, пародонтопатогенная микрофлора, пародонтальный карман, количественная полимеразная цепная реакция.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ПЦР – полимеразная цепная реакция; ХГП – хронический генерализованный пародонтит.

ВВЕДЕНИЕ

Полость рта – это одна из наиболее сложных по составу микроорганизмов экосистема организма человека. Слюна, десневая жидкость, пародонтальный карман, биопленка и ряд других биотопов содержат примерно 700 различных видов микроорганизмов [1, 2], которые условно можно разделить на три большие группы: 1) нормофлора, 2) условно-патогенные и 3) патогенные микроорганизмы [3].

Бактериальный профиль биоценоза полости рта определяется рядом экзогенных и эндогенных факторов. Защитные механизмы организма хозяина в значительной степени влияют на вирулентность условно-патогенных и патогенных микроорганизмов в каждом из биотопов. Не секрет, что нарушение соотношения нормальной и условно-патогенной флоры приводит к развитию дисбактериозов и характеризуется относительным снижением содержания лактобактерий и бифидобактерий. Одно из проявлений такого дисбаланса представляет широко распростра-

ненное заболевание – пародонтит. Известно, что существенная роль в развитии пародонтита принадлежит *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythensis* (*Bacteroides forsythus*), *Fusobacterium* spp. и ряду других микроорганизмов [4–6].

С развитием методов молекулярной биологии и, в частности методов качественной и количественной оценки содержания нуклеиновых кислот, стало возможным быстро и точно определять как состав, так и относительное количество микроорганизмов в различных суббиотопах ротовой полости [6–8]. Отличительная особенность современных молекулярно-генетических методов (в частности, количественной ПЦР) – их высокая чувствительность и возможность количественного определения анаэробных микроорганизмов (что зачастую невозможно сделать с помощью классических методов культивирования) [9]. ПЦР в реальном времени позволяет одновременно определять качественный

Таблица 1. Возрастной состав исследованных групп (%)

Возраст	Здоровый контроль (n = 30)	ХГП		
		легкая степень (n = 10)	средняя степень (n = 29)	тяжелая степень (n = 35)
До 35 лет	21	80	24	17
35–44 года	27	20	35	29
45–54 года	33	0	31	34
Старше 55 лет	19	0	10	20

и количественный состав микробиоценоза в любом выбранном биотопе полости рта.

Цель данной работы состояла в количественной оценке соотношения наиболее важных (согласно [9–11]) представителей пародонтопатогенной микрофлоры десневых карманов: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis* (*Bacteroides forsythus*), *Treponema denticola*, *Candida albicans*, у здоровых лиц и у индивидов с пародонтизом разной степени тяжести.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследование проводилось в отделении пародонтологии ФГУ ЦНИИС и ЧЛХ Минздравсоцразвития РФ. Обследовано 104 человека в возрасте от 18 до 65 лет без тяжелой соматической патологии.

Основным критерием для постановки диагноза хронический генерализованный пародонтит (ХГП) служило отсутствие зубодесневого прикрепления. Степень тяжести устанавливали на основании глубины пародонтальных карманов и степени деструкции костной ткани.

Так, при ХГП легкой степени глубина пародонтальных карманов составляла до 3 мм, а рентгенологическая картина подтверждала признаки начальной деструкции межзубных перегородок.

При ХГП средней степени глубина пародонтальных карманов варьировала от 3 до 6 мм, а при обследовании зачастую выявляли патологическую подвижность зубов 1–2 степени. Деструкция кортикальной пластинки и костной ткани межзубных перегородок по данным рентгенологического исследования составляла 1/2–1/3 длины корня.

ХГП тяжелой степени характеризовался наличием пародонтальных карманов более 6 мм, патологической подвижностью зубов 2–3 степени, а при рентгенологическом исследовании выявляли деструкцию кортикальной пластинки и костной ткани более 1/3 длины корня.

Контрольная группа состояла из 30 человек (12 мужчин и 18 женщин) в возрасте от 28 до 55 лет, без жалоб и видимых патологических изменений в тканях пародонта. Данные по возрастному составу групп приведены в табл. 1.

Микрофлору интактного пародонта и пародонтальных карманов изучали с использованием стерильных бумажных эндодонтических штифтов (размер № 25), которые погружали в десневую бороздку или в патологический карман до его дна и оставляли на 10 с. Затем помещали в пробирку с физиологическим раствором, охлаждали и передавали в лабораторию. Дублировали забор материала у каждого пациента.

С целью выявления инфекционных агентов и определения геномной ДНК пациента (как нормировочного показателя) экстрагировали ДНК из биологического материала с помощью комплектов «Проба-ГС» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) согласно прилагаемой инструкции. Метод основан на сорбции ДНК на носителе, отмывке от примесей и последующей элюции нуклеиновых кислот с сорбента. За счет лизиса клеток сильными хаотропными агентами «Проба-ГС» примерно с равной эффективностью разрушает клетки с клеточной стенкой различного типа (грамположительных, грамотрицательных бактерий, грибов). «Проба-ГС» подходит и для экстракции геномной ДНК эукариот (использована нами в качестве нормировочного показателя).

В работе использованы ранее разработанные наборы реагентов, состоящие из специфичных праймеров и специфичной флуоресцентно меченой разрушаемой пробы (типа TaqMan), к шести пародонтопатогенным агентам (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis* (*Bacteroides forsythus*), *Treponema denticola*, *Candida albicans*). С целью оценки общей бактериальной массы, представленной в образце, параллельно с определением патогенных микроорганизмов проводили ПЦР с детекцией кон-

Таблица 2. Доля положительных образцов в группах здоровых лиц и индивидов с ХГП (%)

Микроорганизм	Здоровый контроль (n = 30)	ХГП		
		легкая степень (n = 10)	средняя степень (n = 29)	тяжелая степень (n = 35)
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	10	33	48	43
<i>P. gingivalis</i>	47	70	66	86
<i>P. intermedia</i>	33	70	59	71
<i>T. forsythensis</i>	53	80	97	100
<i>T. denticola</i>	60	80	83	83
<i>C. albicans</i>	10	40	38	60

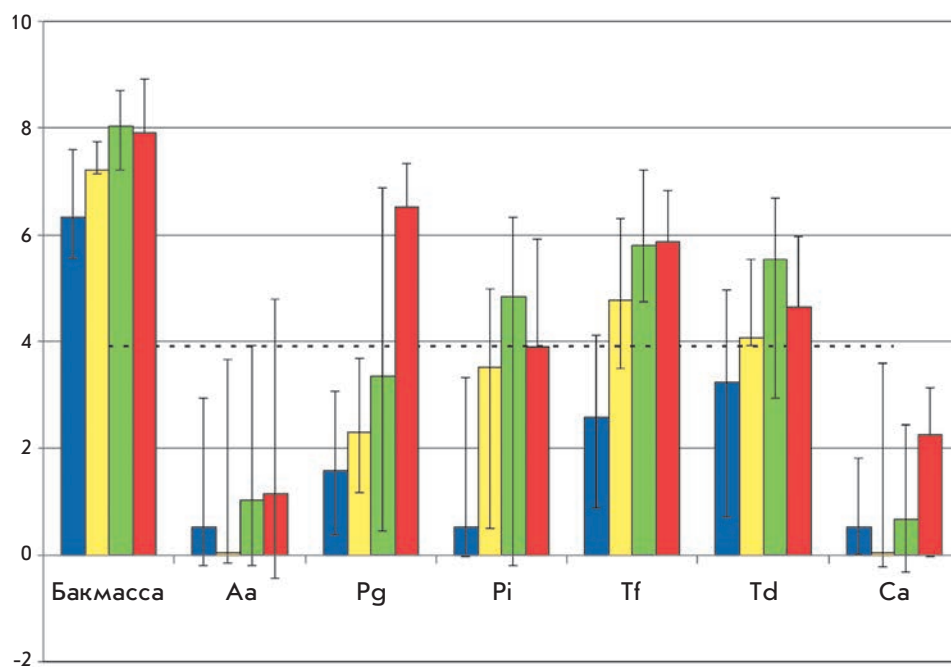
сервативного участка гена 16S рРНК. Для сравнения представленности патогенов в образцах количество копий геном-эквивалентов бактерий каждого вида (а также общую бакмассу) нормировали по количеству геномной ДНК человека (фрагмент гена рецептора гормона роста).

ПЦР проводили с помощью детектирующего амплификатора «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия). Результаты реакции учитывали с помощью программного обеспечения амплификатора «ДТпрайм». Нормированные значения, соответствующие уровню представленности каждого микроорганизма, рассчитывали с помощью метода $\Delta\Delta Ct$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе анализируемую выборку разделили на четыре группы в зависимости от степени тяжести заболевания: 1) здоровый контроль (n = 30); 2) легкая степень ХГП (n = 10); 3) средняя степень ХГП (n = 29); 4) тяжелая степень ХГП (n = 35), где n – численность группы.

Результаты выявления патогенов в каждой группе приведены в табл. 2. Видно, что с развитием заболевания наблюдается тенденция к увеличению числа положительных образцов по всем микроорганизмам. Опубликованные данные по частоте выявления пародонтопатогенов у здоровых лиц и у больных с ХГП существенно различаются [10, 12–14], однако, в боль-



Относительное количество микроорганизмов в норме (синие столбцы) и при ХГП различной степени тяжести (желтые столбцы – легкая степень, зеленые – средняя степень, красные – тяжелая степень и агрессивный пародонтит). Показаны медианы с планками погрешностей 25–75 процентиль. Данные нормированы по содержанию геномной ДНК человека (пунктирная линия). По оси у отложен десятичный логарифм содержания данного компонента в образце (в усл. ед.). Бакмасса – суммарное количество бактерий, Aa – *A. actinomycetemcomitans*, Pg – *P. gingivalis*, Pi – *P. intermedia*, Tf – *T. forsythensis*, Td – *T. denticola*, Ca – *C. albicans*.

шинстве случаев сообщается об аналогичной тенденции. Так, Braga и соавт. [12] выявили *P. intermedia* у 80.0% здоровых ($n = 30$) лиц и у 90.0% индивидов с ХГП ($n = 30$), *P. gingivalis* обнаружена у 46.6% здоровых и у 70.0% лиц с ХГП, а *A. actinomycetemcomitans* – у всех индивидов в обеих группах. Различия в частоте выявления патогенов можно объяснить особенностями формирования групп, возможной (иногда запланированной) штаммоспецифичностью, а также разной чувствительностью используемых тест-систем. Также отметим, что выявление патогенного микроорганизма у всех лиц из контрольной группы может свидетельствовать о контаминации лаборатории продуктами ранее проведенных реакций и должно настораживать авторов.

Мы использовали новый подход к количественной оценке состава микробиоценозов ротовой полости, поэтому смогли найти крайне мало опубликованных данных по относительному содержанию изученных нами патогенов. В работе Нувärinen и соавт. [15], которые определяли относительное содержание *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis* и *T. denticola* в образцах слюны лиц с пародонтитом и у здоровых индивидов, достоверных различий не выявлено.

Результаты определения относительного количества микроорганизмов в норме и при ХГП разной

степени приведены на *рисунке*. Для приведения количества взятого в исследование биоматериала к единому знаменателю, данные нормировали по содержанию уникального фрагмента геномной ДНК человека (фрагмент гена рецептора гормона роста) [16, 17]. Из *рисунка* видно, что по мере развития заболевания наблюдается тенденция к увеличению содержания в пародонтальном кармане как бактерий в целом (показатель «бакмасса»), так и большинства представителей патогенной микрофлоры (причем относительное содержание патогенов растет опережающими темпами). Лидерами роста по мере развития пародонтита являются *P. gingivalis*, *P. intermedia* и *T. forsythensis*, относительное содержание которых в общей бактериальной массе устойчиво увеличивается более чем в 100 раз.

Полученные нами данные свидетельствуют о возможности использования количественной оценки соотношения патогенных представителей микробиоценоза пародонтальных карманов как диагностического инструмента с целью прогнозирования развития пародонтита. В качестве варианта диагностикума можно рекомендовать определение соотношения *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis*, общей бакмассы и геномной ДНК пациента. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Усатова Г.Н. Адгезия и колонизация микроорганизмами полости рта. Автореф. дис. канд. мед. наук. Ростов-на-Дону, 1989. 19 с.
2. Paster B.J., Boches S.K., Galvin J.L., Ericson R.E., Lau C.N., Levanos V.A., Sahasrabudhe A., Dewhirst F.E. // *J. Bacteriol.* 2001. V. 183. P. 3770–3783.
3. Kumar P.S., Griffen A.L., Moeschberger M.L., Leys E.J. // *J. Clin. Microbiol.* 2005. V. 43. № 8. P. 3944–3955.
4. Haffajee A.D., Socransky S.S. // *Periodontol* 2000. 1994. V. 5. P. 78–111.
5. Maiden M.F., Cohee P., Tanner A.C. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2003. V. 53. P. 2111–2112.
6. Takamatsu N., Yano K., He T., Umeda M., Ishikawa I. // *J. Periodontol.* 1999. V. 70. № 6. P. 574–580.
7. Behl Y., Siqueira M., Ortiz J., Li J., Desta T., Faibish D., Graves D.T. // *J. Immunol.* 2008. V. 181. № 12. P. 8711–8718.
8. Boutaga K., Winkelhoff A.J., Vandenbroucke-Grauls I.C., Savelkoul P. // *J. Clin. Microbiol.* 2003. V. 41. № 11. P. 4950–4954.
9. Atieh M.A. // *J. Periodontol.* 2008. V. 79. № 9. P. 1620–1629.
10. Jervøe-Storm P.M., AlAhdab H., Koltzsch M., Fimmers R., Jepsen S. // *Clin. Oral Investig.* 2010. V. 14. № 5. P. 533–541.
11. Naka S., Yamana A., Nakano K., Okawa R., Fujita K., Kojima A., Nemoto H., Nomura R., Matsumoto M., Ooshima T. // *BMC Oral Health.* 2009. V. 9. P. 24.
12. Braga R.R., Carvalho M.A., Bruña-Romero O., Teixeira R.E., Costa J.E., Mendes E.N., Farias L.M., Magalhães P.P. // *Anaerobe.* 2010. V. 16. № 3. P. 234–239.
13. Elamin A., Albandar J.M., Poulsen K., Ali R.W., Bakken V. // *J. Periodontal Res.* 2011. V. 46. № 3. P. 285–291. doi: 10.1111/j.1600-0765.2010.01337.x.
14. Rakić M., Zelić K., Pavlica D., Hadzimirhajlović M., Milasin J., Milčić B., Nikolić N., Stamatović N., Matic S., Aleksić Z., Janković S. // *Vojnosanit. Pregl.* 2010. V. 67. № 11. P. 898–902.
15. Hyvärinen K., Laitinen S., Paju S., Hakala A., Suominen-Taipale L., Skurnik M., Könönen E., Pussinen P.J. // *Innate Immun.* 2009. V. 15. № 4. P. 195–204.
16. Zorina O.A., Tumbinskaya L.V., Rebrikov D.V. // *Dentistry for all.* 2011. № 1. P. 46–48.
17. Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., van Roy N., De Paepe A., Speleman F. // *Genome Biol.* 2002. V. 3. № 7. Research0034.

УДК 612.17

Влияние активации β_2 -адренорецепторов в предсердиях мыши на силу сокращения, Са-сигналы и продукцию оксида азота

Ю. Г. Одношивкина, А. М. Петров*, А. Л. Зефирова

Казанский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию, 420012, Россия, Татарстан, Казань, ул. Бутлерова, 49

*E-mail: fysio@rambler.ru

Поступила в редакцию 28.12.2010 г.

РЕФЕРАТ С помощью тензометрического и флуоресцентного методов исследовали влияние селективного агониста β_2 -адренорецепторов (фенотерола) на функционирование предсердий мыши. Показано, что чем выше концентрация фенотерола (в диапазоне 1–50 мкМ), тем значительнее положительный инотропный эффект и тем быстрее он развивается. При использовании фенотерола в относительно низких дозах (1 и 5 мкМ) эффект проявлялся спустя 20 мин после аппликации агониста, а в высоких дозах (25, 50, 300 мкМ) – в первую минуту аппликации. Фенотерол в концентрации 5 мкМ в течение 10–15 мин увеличивал амплитуду Са-сигналов в кардиомиоцитах (что отражает повышение концентрации ионов Са во время систолы) и синтез оксида азота. Однако через 20 мин после добавления агониста продукция оксида азота снижалась, а амплитуда Са-сигналов сохранялась на повышенном уровне. Фенотерол в концентрации 50 мкМ приводил к быстрому возрастанию величины Са-сигналов, тогда как продукция оксида азота в этот период снижалась и начинала увеличиваться примерно через 10 мин после аппликации агониста. Предполагается, что динамика и выраженность положительного инотропного эффекта при фармакологической стимуляции β_2 -адренорецепторов определяются скоростью увеличения амплитуды Са-сигналов и изменением продукции оксида азота.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА β_2 -адренорецепторы, фенотерол, кальций, оксид азота, сократимость, кардиомиоциты предсердий.

ВВЕДЕНИЕ

Один из основных механизмов, контролирующих сердечную деятельность, связан с воздействием катехоламинов (адреналина и норадреналина) на сопряженные с G-белками β -адренорецепторы кардиомиоцитов [1, 2]. По чувствительности к фармакологическим агентам и структурным особенностям выделяют три вида β -адренорецепторов – β_1 , β_2 и β_3 . Все виды β -адренорецепторов экспрессируются в сердце. Функция β_1 -адренорецепторов хорошо изучена в сердце. О β_2 -адренорецепторах сведений недостаточно: изучено их значение в контроле тонуса сосудов сердца и скелетных мышц, просвета бронхов и метаболизма организма [3].

Содержание β_2 -адренорецепторов особенно высоко в кардиомиоцитах предсердий. Так, если во всем сердце доля β_2 -адренорецепторов достигает 30–40% от общего количества β -адренорецепторов [2], то в кардиомиоцитах предсердий человека их доля

превышает 55% [4]. Стимуляция β_2 -адренорецепторов увеличивает силу сокращения кардиомиоцитов желудочков сердца крысы, не влияя заметно на скорость расслабления [5]. Предполагается, что активация β_2 -адренорецепторов вызывает положительную инотропную реакцию без повышения риска возникновения аритмий и внезапной смерти животного [6]. Следует упомянуть, что при стимуляции β_2 -адренорецепторов инотропный эффект может быть и отрицательным, например, в сосочковых мышцах сердца морской свинки [7].

Эффект стимуляции β_2 -адренорецепторов на сократимость кардиомиоцитов желудочков определяется взаимодействием рецептора с Gs-белком, стимулирующим аденилатциклазный каскад, который приводит к активации протеинкиназы А. Под влиянием этой киназы увеличиваются вероятность открытия и проводимость части Са-каналов L-типа и, следовательно, количество поступающих в цито-

плазму в течение потенциала действия ионов Ca [8, 9]. Однако активированные β_2 -адренорецепторы также стимулируют Gi-белки, которые угнетают аденилатциклазный каскад и таким образом ограничивают положительный инотропный эффект агонистов β_2 -адренорецепторов [10, 11]. Активация Gi-белков ведет к стимуляции каскада фосфоинозитол-3-киназа (ФИЗК)–протеинкиназа В, направленного на поддержание выживания клеток, их защиту от действия активных форм кислорода и гипоксии [12, 13]. Путь ФИЗК–протеинкиназа В может запускать также увеличение продукции оксида азота (NO), действуя на гуанилатциклазную систему, способен ослаблять эффекты агонистов β_2 -адренорецепторов [14, 15], но вместе с тем препятствовать десенситизации β_2 -адренорецепторов [16]. Высказываются предположения о кардиопротекторной роли β_2 -адренорецепторов, и агонисты β_2 -адренорецепторов позиционируются как перспективные фармакологические агенты [13]. Так, у мышей со сверхэкспрессией β_2 -адренорецепторов не развивается сердечная недостаточность и отсутствуют признаки разрушения кардиомиоцитов на фоне повышенной частоты и силы сердечных сокращений, наблюдаемых даже в отсутствие стимуляции β_2 -адренорецепторов эндогенными лигандами [17]. Дело в том, что независимо от присутствия агонистов во внеклеточной среде β_2 -адренорецепторы могут спонтанно переходить в активное состояние [18]. Интересно, что при спонтанной активации β_2 -адренорецепторов сократимость увеличивается без изменения входящего Ca-тока через Ca-каналы L-типа [19].

β_2 -Адренорецепторы – очень «гибкие» молекулы, у которых охарактеризовано несколько активных состояний (конформаций). В зависимости от конформации изменяются свойства рецептора, в том числе способность связываться с эффекторными сигнальными белками, которыми могут быть не только G-белки, но и тирозинкиназа Src, фактор, регулирующий Na/H-обмен, аррестин, N-этилмалеимидчувствительный фактор, некоторые каркасные белки [20–24]. Недавно показали, что разные агонисты переводят β_2 -адренорецепторы в специфичные активные конформации, поэтому от типа агониста зависит клеточный ответ (этот феномен называют «функциональной селективностью» агонистов) [25]. Фенотерол – один из широко применяемых в клинике и эффективных агонистов β_2 -адренорецепторов короткого действия. Под его влиянием в гладкомышечных клетках дыхательных путей человека существенно возрастает уровень cAMP и активируются MAP-киназы (mitogen-activated protein kinase) [25], а в эндотелиальных клетках усиливается синтез NO [26]. Следует отметить,

что под действием фенотерола β_2 -адренорецепторы подвергаются интенсивному фосфорилированию киназами рецепторов, сопряженных с G-белками, и в дальнейшем поглощаются в ходе клатрин-опосредованного эндоцитоза. В итоге продолжительное действие фенотерола ведет к десенситизации и снижению количества β_2 -адренорецепторов на поверхности бронхиального эпителия [25, 27]. Появляются данные об уникальных свойствах фенотерола и его стереоизомеров, которые могут использоваться для создания фармакологических препаратов, обладающих высокой степенью селективности и выраженными кардиопротекторными свойствами [28, 29].

Роль β_2 -адренорецепторов кардиомиоцитов предсердий не совсем понятна. Имеются сведения об увеличении силы сокращений и входящего Ca-тока при стимуляции β_2 -адренорецепторов предсердий морской свинки, кошки и человека [15, 30, 31]. Однако у мышей, сверхэкспрессирующих β_2 -адренорецепторы человека, активация β -адренорецепторов предсердий изопrenalином вызывает негативный инотропный эффект, тогда как в норме изопrenalин, действуя преимущественно через β_1 -адренорецепторы, оказывает положительный инотропный эффект [32, 33]. В представленной работе изучено влияние разных доз фенотерола-рацемата – широко применяемого в медицинской практике агониста β_2 -адренорецепторов, на силу сокращений предсердий, амплитуду Ca-сигналов и продукцию NO.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Эксперименты проведены на изолированных предсердиях белых мышей. Использовали стандартный раствор Кребса для теплокровных животных следующего состава, mM: NaCl – 144.0, KCl – 5.0, MgCl₂ – 0.1, CaCl₂ – 2.0, NaH₂PO₄ – 1.0, NaHCO₃ – 2.4, глюкоза – 11.0, который насыщали кислородом. pH растворов поддерживали на уровне 7.2–7.4 при температуре 20°C. Во время опыта препарат стимулировали электрическими импульсами сверхпороговой амплитуды с частотой 0.1–1 Гц через платиновые электроды. В большинстве опытов использовали аппликацию (20 мин) агониста β_2 -адренорецепторов (\pm)-фенотерола (Sigma, США) в концентрации 1–300 мкМ. В некоторых случаях применяли селективный блокатор β_2 -адренорецепторов – ICI-118.551 (Tocris, США) в концентрации 0.1 мкМ.

Тензометрия

Сокращения предсердий регистрировали с помощью установки PowerLab. Один конец изолированного предсердия подвязывали к фиксированному стержню, второй – к стержню, соединенному с тензодат-

чиком с чувствительностью 0–25 г (AD Instruments). Сигналы обрабатывали с помощью оригинальной компьютерной программы Chart, силу сокращения определяли в граммах.

Флуоресцентная микроскопия

Флуоресценцию наблюдали с помощью микроскопов OLYMPUS CX41 (со сменными монохроматическими источниками возбуждающего света) и OLYMPUS BX51 (оснащенного конфокальной системой DSU) с использованием объективов LMPlanFI 20×/0.40 и UPlanSApo 60×/1.20W. Изображения регистрировали быстродействующими CCD-видеокамерами фирмы OLYMPUS, черно-белой F-View II и цветной DP71. Для обработки изображений применяли программы Cell[^]A, Cell[^]P и ImagePro. Интенсивность свечения оценивали в относительных единицах (отн.ед.), соответствующих значению яркости в пикселях.

Измерение внутриклеточной концентрации ионов Ca. Изменения концентрации Ca²⁺ определяли с помощью красителя Fluo-4, который позволяет точно измерять концентрации Ca²⁺ в диапазоне от 1 мкМ до 1 мМ. Fluo-4 слабо флуоресцирует в отсутствие Ca²⁺, однако при связывании с ионами Ca флуоресценция Fluo-4 увеличивается более чем в 100 раз [34]. Мы применяли мембранопроникающую форму красителя, Fluo-4-AM (Molecular Probes, США), которую растворяли в DMSO (диметилсульфоксид, Sigma, США) и хранили в замороженном виде (не более недели) в темноте. Непосредственно перед экспериментом в порцию Fluo-4-AM добавляли неионный детергент Pluronic F-127 (Molecular Probes, США), который способствует растворению неполярного Fluo-4-AM в водном (физиологическом) растворе. В рабочем растворе конечная концентрация Fluo-4-AM составляла 1 мкМ, а содержание DMSO и Pluronic F-127 не превышало 0.0005%. Препарат изолированного предсердия выдерживали в растворе, содержащем 1 мкМ Fluo-4-AM, в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем в течение 40 мин препарат перфузировали физиологическим раствором (в течение этого времени в цитоплазме заканчивалась реакция деэтерификации Fluo-4-AM и образования гидрофильного Fluo-4, который не может проходить через мембрану во внеклеточную среду [34]). После этого начиналась регистрация флуоресценции в пучке кардиомиоцитов изолированного предсердия. Флуоресценцию красителя возбуждали короткими (около 1 с) вспышками света с длиной волны 480 нм, а свечение регистрировали с использованием эмиссионного светофильтра, пропускающего свет с длиной волны более 515 нм. В ходе циклов сокращения–расслабления препарата наблюдались периодические изменения свечения

Ca-сенсора в виде вспышек («Ca-сигналов»): яркость свечения повышалась в момент сокращения и снижалась при расслаблении. Ca-сигналы отражают повышение концентрации ионов Ca, которое запускает сокращение кардиомиоцитов. Для оценки амплитуды Ca-сигналов из значения максимальной флуоресценции (в период систолы) вычитали минимальную величину флуоресценции в период диастолы.

Измерение концентрации оксида азота (NO). Продуцию оксида азота детектировали при помощи маркера DAF-FM-диацетата (Molecular Probes, США), который возбуждали светом длиной волны $\lambda = 495$ нм, а при регистрации флуоресценции применяли эмиссионный фильтр, пропускающий свет с длиной волны более 515 нм. DAF-FM-диацетат легко проходит через клеточные мембраны, а внутри клетки деацетируется внутриклеточными эстеразами и превращается в DAF-FM. DAF-FM практически не флуоресцирует до вступления в реакцию с NO, но при взаимодействии с NO его флуоресценция возрастает более чем в 160 раз [29]. DAF-FM растворяли в DMSO и хранили в замороженном виде в защищенном от света месте. Препарат изолированного предсердия выдерживали в растворе с 2 мкМ DAF-FM-диацетатом в течение 30 мин при комнатной температуре. Далее препарат перфузировали физиологическим раствором, не содержащим краситель, в течение 20 мин (время, за которое заканчивается реакция деацетилирования маркера [35]), после чего регистрировали флуоресценцию в пучке кардиомиоцитов изолированного предсердия.

Статистический анализ проводили при помощи программы Origin Pro. Результаты измерений представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка (n – число независимых опытов). Достоверность различий определяли с помощью критериев Стьюдента и ANOVA.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Дозозависимость инотропного эффекта фенотерола

Амплитуда сокращений. Добавление фенотерола в концентрации от 1 до 300 мкМ вызывало существенное увеличение силы сокращения (рис. 1а,б). Аппликация 1 и 5 мкМ фенотерола повышала силу сокращений до $134.0 \pm 4.4\%$ ($p < 0.01$, $n = 5$) и $144.6 \pm 5.1\%$ ($p < 0.01$, $n = 5$) относительно контрольного значения соответственно. Под действием фенотерола (25 и 50 мкМ) сила сокращений еще более возрастала – до $159.7 \pm 5.5\%$ ($p < 0.01$, $n = 6$) и $176.2 \pm 6.6\%$ ($p < 0.01$, $n = 8$). Однако в концентрации 300 мкМ фенотерол повышал амплитуду сокращений

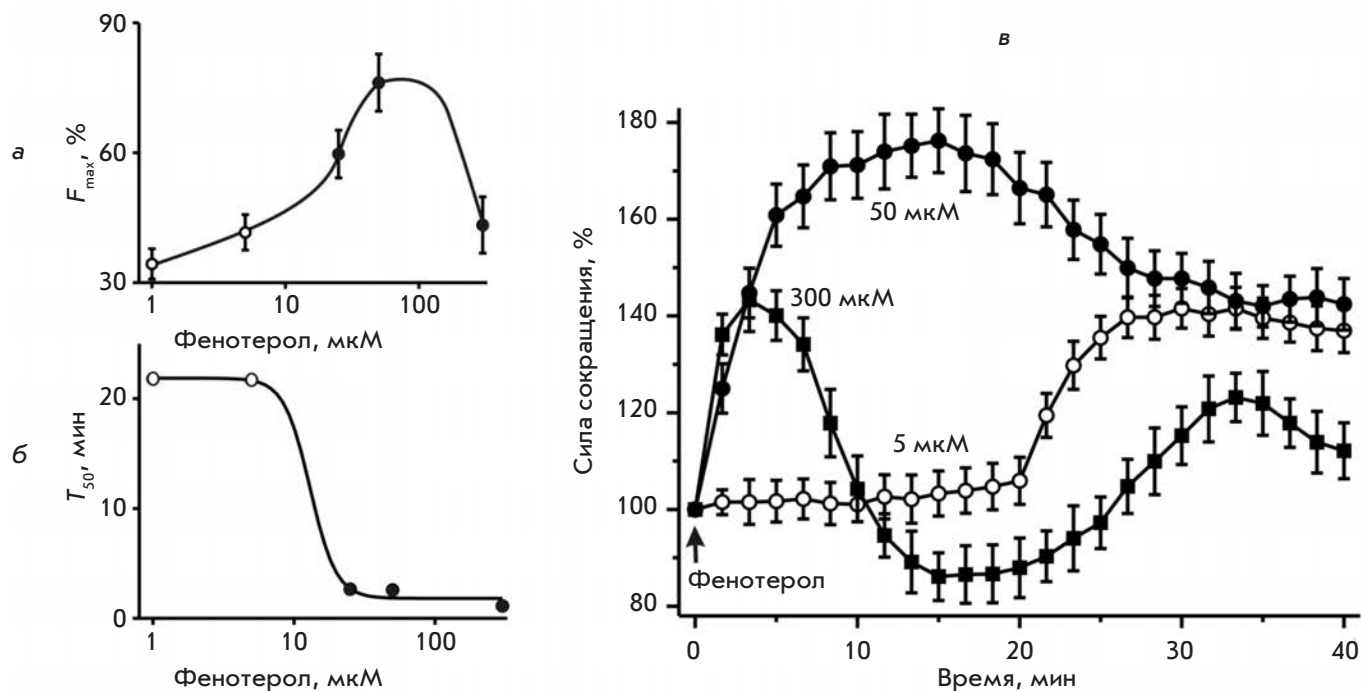


Рис. 1. Влияние фенотерола на силу сокращения изолированных предсердий.

а, б – Влияние разных доз фенотерола на сократимость (а) и время появления эффекта (б). По оси ординат: а – максимальная амплитуда сокращений (F_{max} , за «0» принято значение до аппликации фенотерола); б – время от начала аппликации фенотерола до момента, когда амплитуда сокращения достигала 50% от максимальной (T_{50}). По оси абсцисс – логарифмическая шкала концентраций (μM).

в – Изменение силы сокращения предсердий под действием 5, 50 и 300 μM фенотерола (светлые, темные кружки и темные квадраты соответственно). По оси ординат – сила сокращения в % (за 100% принята сила сокращения до аппликации фенотерола). Момент начала аппликации фенотерола обозначен стрелкой.

Данные об изменении силы сокращений предсердий под влиянием фенотерола в концентрации 1 ($n = 5$), 5 ($n = 5$), 25 ($n = 6$), 50 ($n = 8$), 300 ($n = 5$) μM получены в независимых экспериментах.

только до $143.3 \pm 6.5\%$ ($p < 0.01$, $n = 5$) (рис. 1в). Учитывая, что β_2 -адренорецепторы относительно быстро подвергаются десенситизации при действии высоких доз агонистов, можно предположить, что не столь выраженное влияние фенотерола в концентрации 300 μM на сократимость скорее всего связано с процессами десенситизации [27, 36].

Время проявления эффекта. Скорость проявления положительного инотропного эффекта фенотерола изменялась в зависимости от его концентрации: чем выше концентрация, тем раньше наблюдалось увеличение силы сокращений (рис. 1а,б). Увеличение амплитуды сокращений начиналось только через 20 мин от начала аппликации фенотерола в концентрации 1 и 5 μM , а максимальная сила сокращений отмечалась через 30–40 мин. При применении 25 и 50 μM фенотерола амплитуда сокращений увеличивалась существенно быстрее: примерно через 15 и 13

мин после добавления агониста сила сокращений достигала максимального значения. Фенотерол в концентрации 300 μM уже через 3 мин обеспечивал максимальную амплитуду сокращений.

«Отставленный» эффект фенотерола. Как уже было сказано, положительный инотропный эффект фенотерола в низких концентрациях регистрируется очень поздно (через 20–25 мин) (рис. 1в). Чтобы выяснить, с чем связано столь медленное развитие эффекта, мы провели дополнительные опыты, в которых раствор с фенотеролом (5 μM) через 20 мин (т.е. до начала усиления сокращений) заменяли нормальным раствором Кребса. Оказалось, что несмотря на отсутствие фенотерола в наружном растворе, сила сокращений возрастала. Через 10 мин после удаления фенотерола из раствора, омывающего препарат, амплитуда сокращений достигала максимума и составляла $141.6 \pm 4.1\%$ от контрольного значения

($p < 0.01$, $n = 8$), а затем постепенно уменьшалась. Это свидетельствует о том, что отставленный эффект низких концентраций агониста β_2 -адренорецептора связан с запуском внутриклеточных сигнальных систем, действие которых развивается медленно.

В дальнейшем использовались две концентрации фенотерола: 5 мкМ, при которой наблюдался отставленный во времени эффект, и 50 мкМ, при которой сила сокращений быстро увеличивалась (рис. 1в). Следует отметить, что на фоне селективного блокатора β_2 -адренорецепторов (0.1 мкМ ICI-118.551) положительный инотропный эффект фенотерола в концентрации 5 и 50 мкМ не проявлялся (данные не приведены).

Влияние фенотерола на Са-сигналы

Динамика изменений внутриклеточной концентрации ионов кальция, запускающих сокращения кардиомиоцитов, существенно меняется под воздействием фенотерола (рис. 2). Низкая концентрация фенотерола (5 мкМ) ведет к постепенному увеличению амплитуды Са-сигналов. К 3 мин аппликации β_2 -агониста амплитуда Са-сигналов достигала $122.6 \pm 4.7\%$ ($p < 0.05$, $n = 7$), а к 10 мин – $152.1 \pm 4.9\%$ ($p < 0.01$, $n = 7$) от исходных значений. После 15 мин аппликации агониста амплитуда Са-сигналов несколько снижалась, а через 20 мин стабилизировалась на повышенном уровне – около 130–140%. Через 5 мин после замены наружного раствора раствором без фенотерола величина Са-сигналов составляла $133.6 \pm 4.7\%$ ($p < 0.01$, $n = 7$). Амплитуда Са-сигналов возвращалась к исходному уровню примерно через 60–70 мин после удаления фенотерола из внеклеточного раствора. Аппликация фенотерола в высокой концентрации (50 мкМ) вызывала повышение амплитуды Са-сигналов до $121.9 \pm 4.9\%$ ($p < 0.05$, $n = 7$) уже через 30 с, а к 3 мин амплитуда достигала максимального значения – $154.5 \pm 4.8\%$ ($p < 0.01$, $n = 7$). Через 8 мин аппликации величина Са-сигналов начинала снижаться, и к 20 мин от начала действия фенотерола составляла $111.2 \pm 4.3\%$ ($p < 0.05$, $n = 7$). Восстановление исходной величины Са-сигналов происходило через 50–60 мин после начала перфузии препарата раствором без фенотерола.

Воздействие фенотерола на продукцию оксида азота

Под влиянием фенотерола флуоресценция маркера DAF-FM (показатель продукции NO) в кардиомиоцитах предсердий достоверно возрастала (рис. 3). Фенотерол в низких дозах запускал постепенное увеличение продукции оксида азота, а к 20 мин аппликации фенотерола интенсивность флуоресценции увеличивалась до $104.0 \pm 0.7\%$ ($p < 0.05$, $n = 6$). После удаления фенотерола из наружного раствора флуоресценция быстро снижалась до $95.0 \pm 1.4\%$ ($p < 0.05$, $n = 6$)

от исходного уровня и в течение 10 мин возвращалась к исходному уровню. Под действием высокой дозы фенотерола в первые 5 мин аппликации наблюдалось снижение интенсивности флуоресценции DAF-FM (к 5 мин интенсивность флуоресценции составляла $95.9 \pm 0.8\%$) ($p < 0.05$, $n = 6$). После 8 мин аппликации фенотерола интенсивность флуоресценции начинала возрастать и достигала $103.9 \pm 0.6\%$ ($p < 0.05$, $n = 6$) через 20 мин. После перфузии препарата раствором, не содержащим фенотерол, интенсивность флуоресценции превышала контрольный уровень в течение 10–15 мин и составляла 104.3–106.7% ($p < 0.05$, $n = 6$) от исходной величины.

ОБСУЖДЕНИЕ

Медленное развитие и стойкость эффектов фенотерола в концентрации 1 и 5 мкМ свидетельствуют о запуске при стимуляции β_2 -адренорецепторов внутриклеточных сигнальных систем, имеющих длительное действие. По нашему мнению, влияние фенотерола на инотропную функцию предсердий можно объяснить взаимодействием β_2 -адренорецепторов с несколькими внутриклеточными сигнальными каскадами, разнонаправленно регулирующими силу сокращения.

Ключевым фактором, определяющим силу сокращения сердечной мышцы, служит концентрация ионов Са в момент систолы в кардиомиоцитах. Сокращения кардиомиоцитов инициируются ионами Са, которые поступают в цитозоль из двух основных источников. Деполяризация мембраны во время потенциала действия открывает потенциал-управляемые Са-каналы, через которые ионы Са устремляются в цитоплазму, где связываются с рианодиновыми рецепторами (Са-освобождающими каналами) саркоплазматического ретикулула. В итоге ионы Са лавинообразно освобождаются из ретикулула, и концентрация Ca^{2+} в цитоплазме достигает максимального значения. В наших опытах аппликация фенотерола приводила к существенному повышению величины Са-сигналов (рис. 2), что может объясняться увеличением входа Ca^{2+} через каналы плазматической мембраны. Известно, что β_2 -адренорецепторы, как и β_1 -адренорецепторы, связываются с Gs-белками, которые стимулируют аденилатциклазу, катализирующую синтез вторичного посредника — сАМР. В результате активируются сАМР-зависимые протеинкиназы, которые фосфорилируют специфичные белки-мишени [37]. Один из главных субстратов протеинкиназы А – Са-канал L-типа, который в фосфорилированном состоянии имеет большую проводимость и вероятность открытия и активируется при более негативных значениях мембранного потенциала [9, 31].

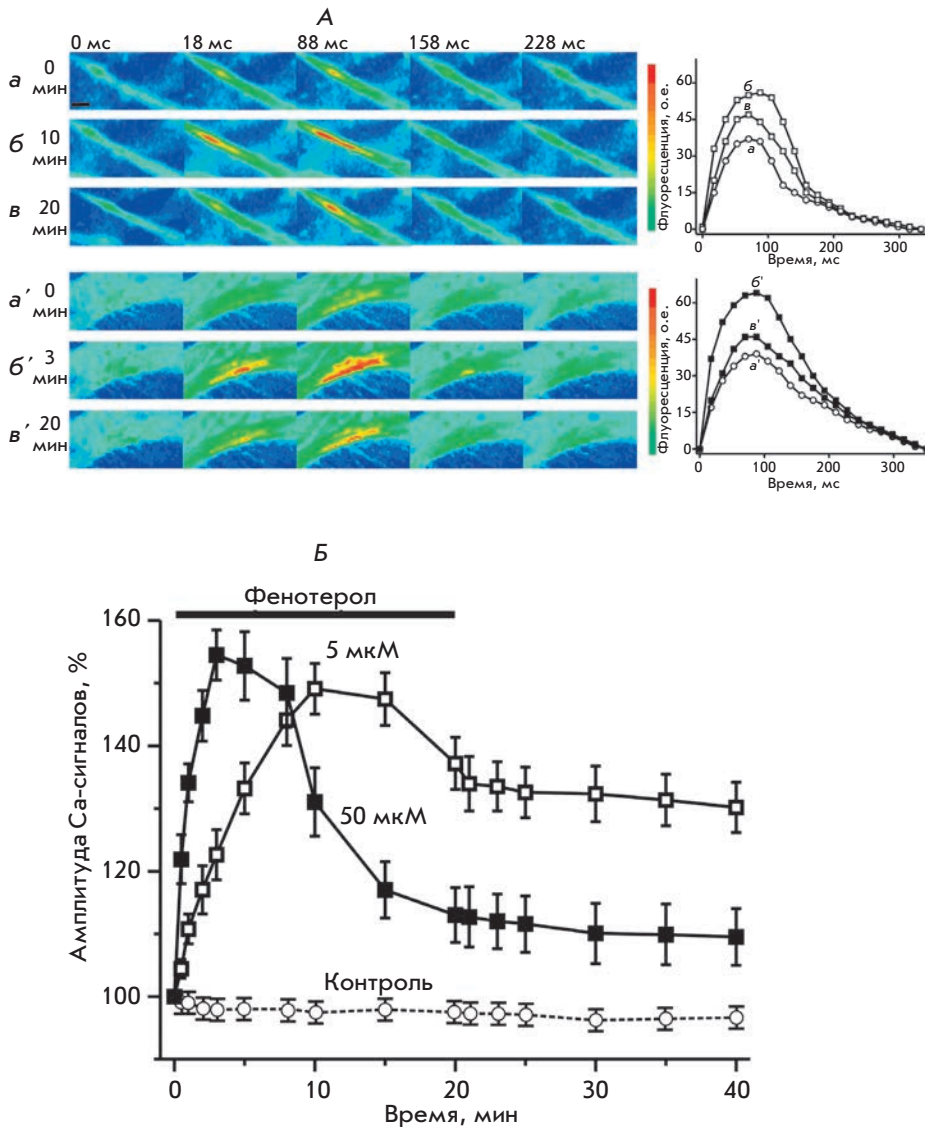


Рис. 2. Влияние фенотерола на Са-сигналы кардиомиоцитов в изолированных предсердиях. А – Изменение флуоресценции Са-индикатора Fluo-4, загруженного в кардиомиоциты изолированного предсердия. Представлены кадры (в псевдоцвете), иллюстрирующие Са-сигнал в кардиомиоцитах изолированного предсердия во время одиночного сокращения до (а, а') и после аппликации фенотерола в концентрации 5 (б, в) и 50 мкМ (б', в'). Над кадрами указано время от момента нанесения стимула (в мс): 0, 18, 88, 158, 228. Масштабная черта – 10 мкм. Справа – кривые изменения интенсивности флуоресценции Fluo-4 в ответ на стимул. По оси ординат – интенсивность флуоресценции в о.е. (за «0» принята величина флуоресценции до момента раздражения), по оси абсцисс – время (мс) от нанесения стимула. Б – Воздействие 5 (n = 7) и 50 (n = 7) мкМ фенотерола на амплитуду Са-сигналов в участках изолированных предсердий (светлые и черные квадраты соответственно). Светлыми кружками, соединенными пунктирной линией, показано изменение амплитуды Са-сигналов в отсутствие фенотерола (контроль, n = 5). По оси ординат – амплитуда Са-сигналов в % (за 100% принята амплитуда Са-сигнала до добавления фенотерола). Аппликация фенотерола обозначена чертой.

Нами обнаружен следующий интересный факт. Фенотерол в концентрации 5 мкМ вызывает медленное возрастание Са-сигналов, амплитуда которых остается повышенной после удаления фенотерола из раствора, омывающего препарат. В то же время в концентрации 50 мкМ фенотерол быстро увеличивает амплитуду Са-сигналов (рис. 2).

Можно представить три варианта объяснения данного феномена. Во-первых, можно предположить, что фенотерол в более высокой дозе начинает действовать не только на β_2 -, но и на β_1 -адренорецепторы, которые зависимы от протеинкиназы А образом активируют дополнительное количество Са-каналов. Так, константа связывания фенотерола (стереоизомеров R,R-1 и -2) с β_1 -адренорецепторами клеток НЕК оценивается примерно в 15–20 мкМ [28]. Кроме

того, наиболее эффективная концентрация фенотерола, под влиянием которой максимально увеличивается сила сокращений препаратов изолированных папиллярных мышц человека, составила 100 мкМ, при этом эффект фенотерола зависел от β_2 - и β_1 -адренорецепторов [38]. Однако такое объяснение противоречит нашим результатам, согласно которым селективный блокатор β_2 -адренорецепторов (0.1 мкМ ICI-118.551) полностью устранял положительный инотропный эффект 50 мкМ фенотерола. Вторым объяснением может быть вовлечение большего количества метаболитных β_2 -адренорецепторов, что приводит к усиленной продукции сАМР и активации большего числа молекул протеинкиназы А, которые интенсивнее фосфорилируют Са-каналы, делая их более активными [1]. Однако в кардио-

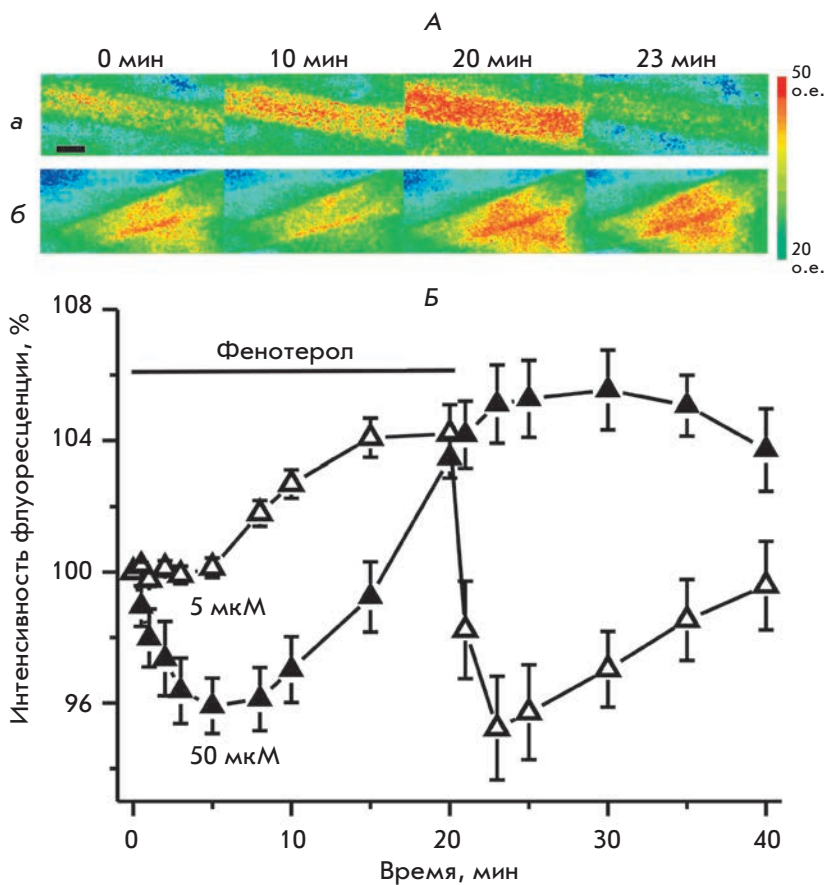


Рис. 3. Влияние фенотерола на продукцию оксида азота в кардиомиоцитах изолированных предсердий. А – Изменение интенсивности флуоресценции маркера DAF-FM, предварительно загруженного в кардиомиоциты изолированного предсердия, в ответ на аппликацию 5 (а) и 50 (б) мкМ фенотерола. Приведены изображения пучков кардиомиоцитов в изолированных предсердиях (интенсивность флуоресценции показана с помощью псевдоцвета). Масштабная черта – 10 мкм. Б – Динамика интенсивности флуоресценции маркера DAF-FM (показатель продукции оксида азота). По оси ординат – интенсивность флуоресценции в % (за 100% принята величина флуоресценции до добавления фенотерола). Фенотерол в концентрации 5 ($n = 6$) и 50 ($n = 6$) мкМ – светлые и черные треугольники соответственно. В контрольных условиях (без добавления фенотерола) флуоресценция маркера не изменялась (данные не представлены). Аппликация фенотерола обозначена чертой.

миоцитах желудочков крысы *R,R*-стереоизомер фенотерола при концентрации около 0.5 мкМ активирует практически все β_2 -адренорецепторы [39]. По приблизительным оценкам, используемый нами фенотерол-рацемат уже в концентрации 2 мкМ оккупирует около 90% β_2 -адренорецепторов эпителиальных клеток бронхов [27]. Поэтому вероятно, что под влиянием фенотерола в концентрации 5 и 50 мкМ активируется приблизительно одинаковое число β_2 -адренорецепторов. В-третьих, появляются данные о том, что в зависимости от дозы агониста β_2 -адренорецепторы могут «нанимать» для передачи сигнала внутрь клетки различные сигнальные каскады и/или с разной эффективностью связываться с эффекторными молекулами [22]. Так, при применении высоких доз агониста (100 мкМ изопротеренола) изолированные β_2 -адренорецепторы могут находиться в двух различных конформациях [40], в которых активированный рецептор может с разной эффективностью взаимодействовать с G-белками и другими белками. Интересно, что в ответ на аппликацию избирательно высоких доз агониста β_2 -адренорецептор начинает активировать не только Gs-белки, но и тирозинкиназу Src, которая управляет сигнальными белками (например, MAP-киназой) и фосфорилирует

β_2 -адренорецептор. Фосфорилированные остатки тирозина β_2 -адренорецепторов могут служить крепежными сайтами для других сигнальных молекул [22]. Кроме того, Src-киназа способна регулировать (в том числе активировать) работу Ca-канала L-типа, прямо связываясь с N-концевой областью $\alpha 1$ -субъединицы канала и фосфорилируя ее [41]. Возможно, быстрое увеличение амплитуды Ca-сигналов под влиянием 50 мкМ фенотерола происходит за счет активации дополнительного пути (например, связанного с Src-киназой), усиливающего работу Ca-каналов L-типа. На наш взгляд, это предположение наиболее вероятно и в первую очередь подлежит экспериментальной проверке.

В проведенном исследовании впервые обнаружено увеличение образования оксида азота в кардиомиоцитах предсердий под действием фенотерола (рис. 3). Продукция оксида азота является важным фактором, регулирующим силу сокращения кардиомиоцитов. Усиление синтеза оксида азота может вызывать отрицательный инотропный эффект и/или препятствовать увеличению силы сокращений кардиомиоцитов [42]. Подобное действие оксида азота может быть сопряжено с активацией cGMP-зависимых протеинкиназ G, которые, фосфорилируя тропонин I, сни-

жают чувствительность тропонина С к Са, а влияя на Са-каналы, уменьшают Са-проводимость [43, 44]. Поскольку эффект оксида азота связан с активацией гуанилатциклазы, которая во «включенном» состоянии продуцирует тысячи молекул сGMP, то даже небольшое увеличение синтеза NO способно значительно повлиять на функционирование клетки [45].

Можно предложить несколько гипотетических механизмов сопряжения β_2 -адренорецепторов с NO-синтазой, отвечающей за образование оксида азота. β_2 -Адренорецепторы способны взаимодействовать с Gi-белками, однако активированный рецептор связывается с Gi-белком менее «охотно», чем с Gs-белком [46]. Предполагается, что активированный β_2 -адренорецептор дольше пребывает в состоянии, для которого характерно высокое сродство к Gs-белку, и меньше времени проводит в состоянии, в котором избирательно связывается с Gi-белком [47]. В соответствии с другой гипотезой, β_2 -адренорецептор может взаимодействовать с Gi-белком только после фосфорилирования протеинкиназой А или киназой рецепторов, сопряженных с G-белками [48]. α -Субъединицы Gi-белков угнетают продукцию сAMP аденилатциклазами, а димеры $\beta\gamma$ -субъединиц влияют на некоторые ионные каналы и сигнальные молекулы, в частности активируют сигнальный путь ФИЗК–протеинкиназа В [1, 49]. Одним из эффекторов данного пути служит NO-синтаза (нейрональная и эндотелиальные изоформы), активность которой усиливается после фосфорилирования протеинкиназой В [50]. В клетках эндотелия крыс под влиянием фенотерола усиливается зависимость от пути ФИЗК–протеинкиназа В активность эндотелиальной NO-синтазы [26]. Однако в кардиомиоцитах желудочков крысы и предсердий кошки фенотерол (в концентрации 0.1 мкМ) не стимулировал путь, связанный с Gi-белком и продукцией NO, а его действие на сократимость было полностью связано с Gs-белком [15, 51].

Недавно показали, что активация Gi-белка в клетках HEK293 под действием фенотерола не зависит от ERK1/2-киназы (extracellular signal-regulating kinases) [29]. В кардиомиоцитах крысы ERK1/2 фосфорилируется и активируется в NO-зависимом пути [52]. Возможно, β_2 -адренорецепторы способны активировать NO-синтазу независимо от G-белка. Фактором, сопрягающим активацию рецептора и усиление синтеза NO, может служить белок β -аррестин 2, который взаимодействует одновременно с β_2 -адренорецепторами и NO-синтазой [53]. Стимулируемая β_2 -адренорецепторами Src-киназа также фосфорилирует эндотелиальную NO-синтазу по остатку Tyr83, усиливая синтез NO [54]. Кроме того, активации NO-синтазы способствует комплекс ионов Са

с кальмодулином [42], поэтому усиление продукции NO, вероятно, частично связано с увеличением концентрации ионов Са за счет большей активности Са-каналов L-типа.

Интересно отметить, что в нашей работе продукция оксида азота начинала возрастать практически сразу после аппликации фенотерола в низкой концентрации, тогда как в высокой концентрации фенотерол сначала несколько снижал, а затем увеличивал синтез NO. Возможно, в последнем случае резкое увеличение продукции сAMP первоначально отрицательно сказывалось на работе NO-синтазы (наши неопубликованные данные), а затем проявлялось активирующее действие сигналов от β_2 -адренорецепторов и повышенного уровня Са.

При рассмотрении эффектов стимуляции β_2 -адренорецепторов не стоит забывать о том, что β_2 -адренорецепторы могут прямо взаимодействовать с фактором, регулирующим Na/H-обмен, N-этилмалеимидчувствительным фактором (контролирующим интернализацию рецепторов и взаимодействие с Gi-белками) и с каркасными белками, соединяющими адренорецепторы с протеинкиназами А, С, фосфатазой 2А, Са-каналами L-типа [20, 22–24]. В итоге димеры β_2 -адренорецепторов могут собирать вокруг себя макромолекулярный сигнальный комплекс, который обеспечивает «координированный» ответ клетки на их активацию [55, 56]. Кроме того, β_2 -адренорецепторы, Са-каналы, эндотелиальная NO-синтаза, NADPH-оксидаза и другие регуляторные молекулы колокализуются на территории кавеол – обогащенных холестерином и кавеолином углублений в мембране [55]. Поэтому *in vivo* эффекты стимуляции β_2 -адренорецепторов могут быть связаны с изменением активности большого количества регуляторных молекул в ограниченных регионах клетки.

Известно, что β_2 -адренорецепторы быстро теряют чувствительность к агонистам, а затем количество рецепторов стремительно уменьшается [27, 36]. С учетом этого можно предположить, что под влиянием фенотерола запускаются процессы, препятствующие десенситизации β_2 -адренорецепторов, что объясняет стойкость воздействия фенотерола на амплитуду сокращений и Са-сигналов. Оксид азота способен непосредственно действовать на β_2 -адренорецепторы и белки, участвующие в десенситизации β_2 -адренорецепторов (киназу рецепторов, сопряженных с G-белками), посредством S-нитрозилирования. В результате предотвращается вызванное агонистом снижение чувствительности рецепторов и их количества [16, 53]. В ответ на стимуляцию β_2 -адренорецепторов S-нитрозилированию подвергается динамин – участвующая в эндоцитозе

малая GTP-аза, что облегчает его способность полимеризоваться и образовывать сжимающийся «воротник» [57]. Таким образом, пролонгированный эффект фенотерола, по-видимому, можно объяснить действием оксида азота на рецепторы, киназу рецепторов, сопряженных с G-белками, и динамин. Под влиянием фенотерола увеличение продукции NO может способствовать, с одной стороны, «закрытию» кавеол (сужению поры, соединяющей внеклеточную среду с полостью кавеол), в которые при этом «ловятся» молекулы агониста, а с другой – обеспечивать длительную активность β_2 -адренорецепторов. В этом случае даже удаление фенотерола из внеклеточной среды не приведет к быстрому уменьшению его эффектов.

ВЫВОДЫ

Исходя из полученных данных, можно предположить следующее. Активация β_2 -адренорецепторов относительно низкими дозами агониста запускает одновременно сигнальные каскады, разнонаправленно воздействующие на сократимость предсердий. Поэтому сначала положительный инотропный эффект агониста не проявляется. Однако позже продукция оксида азота снижается при сохранении повышенной амплитуды Ca-сигналов, что ведет к увеличению силы сокращений. В случае стимуляции β_2 -адренорецепторов высокими дозами агониста в работу быстрее включается путь, сопряженный с мощным увеличением ам-

плитуды Ca-сигналов, тогда как усиление продукции оксида азота «запаздывает», поэтому проявляется существенное положительное инотропное действие агониста. Представленный гипотетический двухкомпонентный, разнонаправленный механизм, лежащий в основе изменения силы сокращений предсердий при активации β -адренорецепторов фенотеролом (рацемат), требует дальнейшего детального экспериментального исследования. Фармакологический подход, связанный с применением блокаторов синтеза оксида азота, аденилатциклазной системы, кальциевых каналов L-типа, риадиноновых рецепторов, а возможно, и ингибиторов эндоцитоза, позволит выяснить пути реализации эффектов β_2 -адренорецепторов кардиомиоцитов предсердий и ответить на поставленные в данной работе вопросы. ●

Благодарим за обсуждение полученных результатов и ценные замечания при оформлении статьи И.Р. Ефимова и А.В. Глухова (университет Вашингтона, Сент-Луис, США).

Работа поддержана грантами Министерства образования и науки Российской Федерации (НШ-5250.2010.4 и МК-3840.2010.4), Российского фонда фундаментальных исследований (№ 11-04-00568-а, 11-04-00422-а) и ФЦП 02.740.11.0302.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамочкин Д.В., Сухова Г.С., Розенштраух Л.В. // Кардиология. 2006. Т. 45. № 6. С. 50–53.
2. Buxton B.F., Jones C.R., Molenaar P., Summers R.J. // Br. J. Pharmacol. 1987. V. 92. P. 299–310.
3. Vatner S.F., Young M.A. // Circ. Res. 1986. V. 59. P. 579–596.
4. Hedberg A., Kempf F.Jr., Josephson M.E., Molinoff P.B. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1985. V. 234. P. 561–568.
5. Xiao R.P., Lakatta E.G. // Circ. Res. 1993. V. 73. P. 286–300.
6. Sosunov E.A., Gainullin R.Z., Moise N.S., Steinberg S.F., Danilo P., Rosen M.R. // Cardiovasc. Res. 2000. V. 48. P. 211–219.
7. Faucher F.A., Gannier F.E., Lignon J.M., Cosnay P., Malécot C.O. // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 2008. V. 294. P. 106–117.
8. Davare M.A., Avdonin V., Hall D.D., Peden E.M., Burette A., Weinberg R.J., Horne M.C., Hoshi T., Hell J.W. // Science. 2001. V. 293. P. 98–101.
9. Haase H. // Cardiovasc. Res. 2007. V. 73. P. 19–25.
10. Jo S.H., Leblais V., Wang P.H., Crow M.T., Xiao R.P. // Circ. Res. 2002. V. 91. P. 46–53.
11. Xiao R.P., Ji X., Lakatta E.G. // Mol. Pharmacol. 1995. V. 47. P. 322–329.
12. Chesley A., Lundberg M.S., Asai T., Xiao R.P., Ohtani S., Lakatta E.G., Crow M.T. // Circ. Res. 2000. V. 87. P. 1172–1179.
13. Zhu W.Z., Zheng M., Koch W.J., Lefkowitz R.J., Kobilka B.K., Xiao R.P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. P. 1607–1612.
14. Dansona J.F., Zhangb Y.H., Sears C.E., Edwardsc A.R., Casadeib B., Patersona D.J. // Cardiovasc. Res. 2005. V. 67. P. 613–623.
15. Dedkova E.N., Wang Y.G., Blatter L.A., Lipsius S.L. // J. Physiol. 2002. V. 542. P. 711–723.
16. Whalen E.J., Foster M.W., Matsumoto A., Ozawa K., Violin J.D., Que L.G., Nelson C.D., Benhar M., Keys J.R., Rockman H.A., et al. // Cell. 2007. V. 129. P. 511–522.
17. Milano C.A., Allen L.F., Rockman H.A., Dolber P.C., McMinn T.R., Chien K.R., Johnson T.D., Bond R.A., Lefkowitz R.J. // Science. 1994. V. 264. P. 582–586.
18. Liggett S.B., Tepe N.M., Lorenz J.N. // Circulation. 2000. V. 101. P. 1707–1714.
19. Zhou Y.Y., Cheng H., Song L.S., Wang D., Lakatta E.G., Xiao R.P. // Mol. Pharmacol. 1999. V. 56. P. 485–493.
20. Hall R.A., Premont R.T., Chow C.W., Blitzer J.T., Pitcher J.A., Claing A., Stoffel R.H., Barak L.S., Shenolikar S., Weinman E.J., et al. // Nature. 1998. V. 392. P. 626–630.
21. Peleg G., Ghanouni P., Kobilka B.K., Zare R.N. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. P. 8469–8474.
22. Sun Y., Huang J., Xiang Y., Bastepe M., Jüppner H., Kobilka B.K., Zhang J.J., Huang X.Y. // EMBO J. 2007. V. 26. P. 53–64.
23. Wang Y., Lauffer B., von Zastrow M., Kobilka B.K., Xiang Y. // Mol. Pharmacol. 2007. V. 72. P. 429–439.
24. Xiang Y., Kobilka B. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. P. 10776–10781.
25. Swift S.M., Schwarb M.R., Mhiblachler K.A., Liggett S.B. // Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 2007. V. 136. P. 236–243.
26. Figueroa X.F., Poblete I., Fernández R., Pedemonte C., Cortés V., Huidobro-Toro J.P. // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 2009. V. 297. P. 134–143.
27. Bruce R.W., Roger B., Richard B.C. // Mol. Pharmacol. 2000. V. 58. P. 421–430.

28. Jozwiak K., Woo A.Y., Tanga M.J., Toll L., Jimenez L., Kozocas J.A., Plazinska A., Xiao R.P., Wainer I.W. // *Bioorg. Med. Chem.* 2010. V. 18. P. 728–736.
29. Woo A.Y., Wang T.B., Zeng X., Zhu W., Abernethy D.R., Wainer I.W., Xiao R.P. // *Mol. Pharmacol.* 2009. V. 75. P. 158–165.
30. Iijima T., Taira N. // *Eur. J. Pharmacol.* 1989. V. 163. P. 357–360.
31. Skeberdis V.A., Jurevicius J., Fischmeister R. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1997. V. 283. P. 452–461.
32. Hasseldine A.R., Harper E.A., Black J.W. // *Br. J. Pharmacol.* 2003. V. 138. P. 1358–1366.
33. Prendergast C.E., Shankley N.P., Black J.W. // *Br. J. Pharmacol.* 2000. V. 129. P. 1285–1288.
34. Harkins A.B., Kurebayashi N., Baylor S.M. // *Biophysic. J.* 1993. V. 65. P. 865–881.
35. Kojima H., Urano Y., Kikuchi K., Higuchi T., Hirata Y., Nagano T. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1999. V. 38. P. 3209–3212.
36. Liggett S.B. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000. V. 161. P. 197–201.
37. DiPilato L.M., Zhang J. // *Circ. Res.* 2006. V. 99. P. 1021–1023.
38. Mügge A., Posselt D., Reimer U., Schmitz W., Scholz H. // *J. Mol. Med.* 1985. V. 63. P. 26–31.
39. Jozwiak K., Khalid C., Tanga M.J., Berzetei-Gurske I., Jimenez L., Kozocas J.A., Woo A., Zhu W., Xiao R.P., Abernethy D.R., et al. // *J. Med. Chem.* 2007. V. 50. P. 2903–2915.
40. Swaminath G., Xiang Y., Lee T.W., Steenhuis J., Parnot C., Kobilka B.K. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 686–691.
41. Dubuis E., Rockcliffe N., Hussain M., Boyett M., Wray D., Gawler D. // *Cardiovasc. Res.* 2006. V. 69. P. 391–401.
42. Balligand J.L., Feron O., Dessy C. // *Physiol. Rev.* 2009. V. 89. P. 481–534.
43. Fiedler B., Wollert K.C. // *Cardiovasc. Res.* 2004. V. 63. P. 450–457.
44. Seddon M., Shah A.M., Casadei B. // *Cardiovasc. Res.* 2007. V. 75. P. 315–326.
45. Уразаев А.Х., Зефиоров А.И. // *Успехи физиологических наук.* 1999. Т. 30. № 1. С. 54–72.
46. Wenzel-Seifert K., Seifert R. // *Mol. Pharmacol.* 2000. V. 58. P. 954–966.
47. Seifert R., Dove S. // *Mol. Pharmacol.* 2009. V. 75. P. 13–18.
48. Liu R., Ramani B., Soto D., De Arcangelis V., Xiang Y. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. P. 32279–32287.
49. Baillie G.S., Sood A., McPhee I., Gall I., Perry S.J., Lefkowitz R.J., Houslay M.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. P. 940–945.
50. Lynch G.S., Ryall J.G. // *Physiol. Rev.* 2008. V. 88. P. 729–767.
51. Xiao R.P., Zhang S.J., Chakir K., Avdonin P., Zhu W., Bond R.A., Balke C.W., Lakatta E.G., Cheng H. // *Circulation.* 2003. V. 108. P. 1633–1639.
52. Xu Z., Ji X., Boysen P.G. // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2004. V. 286. P. 1433–1440.
53. Ozawa K., Whalen E.J., Nelson C.D., Mu Y., Hess D.T., Lefkowitz R.J., Stamler J.S. // *Mol. Cell.* 2008. V. 31. № 3. P. 395–405.
54. Fulton D., Church J.E., Ruan L., Li C., Sood S.G., Kemp B.E., Jennings I.G., Venema R.C. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 35943–35952.
55. Cherezov V., Rosenbaum D.M., Hanson M.A., Rasmussen S.G., Thian F.S., Kobilka T.S., Choi H.J., Kuhn P., Weis W.I., Kobilka B.K., et al. // *Science.* 2007. V. 318. P. 1258–1265.
56. Liu G., Shi J., Yang L., Cao L., Park S.M., Cui J., Marx S.O. // *EMBO J.* 2004. V. 23. P. 2196–2205.
57. Wang G., Moniri N.H., Ozawa K., Stamler J.S., Daaka Y. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. P. 1295–1300.

РОССИЙСКИЕ НАНО ТЕХНОЛОГИИ



Что нового
в области нанотехнологий?

узнай всего за 7200 рублей

7200 РУБЛЕЙ – ЦЕНА ГОДОВОЙ ПОДПИСКИ, ВКЛЮЧАЯ НДС

20% СКИДКА:

...❖ физическим лицам

**Электронная версия журнала
еще дешевле – 4400 рублей в год**

или через Научную электронную
библиотеку: elibrary.ru

Интернет-магазин esmi.subscribe.ru

В базе integrum.ru

В базе park.ru

Каталоги Роспечати
(индексы 59880, 35607)
и «Пресса России» (индекс 42368)

Альтернативные агентства:
Урал-пресс www.ural-press.ru,
Интер-почта www.interpochta.ru,
Информнаука www.informnauka.com,
Артос-Гал www.setbook.ru

Подписка в редакции:

Телефон/ факс: +7 (495) 930 88 50

E-mail: podpiska@nanorf.ru,

Web-site: www.nanoru.ru, www.nanorf.ru

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». 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 μM ; нм, но не nm).
- Знак «–» (тире) отбивается пробелами, знаки «минус», «интервал» или «химическая связь» пробелами не отбиваются.

- В качестве знака умножения используется только «×». Знак «×» ставится только в том случае, если справа от него стоит число. Символом «•» обозначаются комплексные соединения в химических формулах, а также нековалентные комплексы (ДНК-РНК и т.п.).
- Используются только «кавычки», но не “кавычки”.
- В формулах используются буквы латинского и греческого алфавитов.
- Латинские названия родов и видов животного мира пишутся курсивом, таксонов более высокого ранга, а также названия вирусов и бактериофагов в латинской транскрипции – прямым шрифтом.
- Названия генов (кроме обозначения генов дрожжей) пишутся строчным курсивом, названия белков – прямым шрифтом.
- Названия нуклеотидов (A, T, G, C, U), аминокислотных остатков (Arg, 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.

ERRATUM

В статье Е. А. Смирновой, А. А. Гусева, О. Н. Зайцевой, Е. М. Лазаревой, Г. Е. Онищенко, Е. В. Кузнецовой, А. Г. Ткачева, А. В. Феофанова, М. П. Кирпичникова «Углеродные нанотрубки проникают в ткани и клетки и оказывают стимулирующее воздействие на проростки эспарцета *Onobrychis arenaria* (Kit.) Ser.», опубликованной в журнале «Acta Naturae», 2011, т. 3, №1 (8), с. 106–113, авторами была допущена ошибка. В разделе «Экспериментальная часть. Подготовка проб для микроскопии» вместо $PbNO_3$ следует читать цитратом свинца.