

Письмо редакторов

Уважаемые читатели!

Предлагаем вашему вниманию седьмой номер нашего журнала. По традиции, номер открывают обзорные статьи, посвященные актуальным, с нашей точки зрения, проблемам наук о живом. Обзор В.А. Степанова посвящен взаимосвязям между структурой геномов, этнической принадлежностью их обладателей и предсказываемой на их основе склонности к тем или иным заболеваниям. Исследования в этой области открывают путь к персонализированной медицине, которая уже в ближайшее десятилетие станет важным компонентом здравоохранения. В обзоре А.П. Соколенко и др. обсуждается ситуация с раком молочной железы и яичников в России, причем основное внимание уделяется наследственным факторам. Это – проблема огромной актуальности: значительная доля смертности от онкологических заболеваний у женщин приходится именно на эти две разновидности рака. Два обзора относятся к молекулярной генетике эукариот: это статьи Е.В. Дементьевой и С.М. Закияна о дозовой компенсации генов половых хромосом и Е.Р. Галимова о роли p66shc в окислительном стрессе и апоптозе.

Экспериментальные статьи номера, как всегда, представляют широкий спектр дисциплин как в области фундаментальной физико-химической биологии (М.В. Загоскин и др., Р.В. Решетников и др., К.В. Черноризов и В.К. Швядас), так и биомедицинских приложений (А.Н. Глушков и др., А.В. Максименко и др., Л.Е. Сальникова и др.). Особое место среди последних занимает статья С.С. Шишкина и др. «База данных "Протеомика рака простаты"», в которой описана созданная авторами открытая база данных, которая будет полезна широкому кругу пользователей – от специалистов в области протеомики и клеточной биологии до практических врачей-онкологов.

Раздел «Форум» в данном номере журнала посвящен созданию национальных технологических платформ, о начале формирования которых объявило Минобрнауки РФ. Эти платформы по своей идее объединяют представителей науки, бизнеса и государства и призваны обеспечить согласованное инновационное развитие по ключевым экономическим направлениям. Статья И. Стерлигова обобщает опыт ЕС, где такие платформы уже сформированы и вносят решающий вклад в технологический прогресс. Статья М. Муравьевой дает развернутый комментарий к инициативе Правительства РФ и детально разъясняет функционирование будущих платформ. Читатель найдет в ней руководство к действию в поисках в них «своего места». Конкретные примеры интеграции усилий науки, бизнеса и государства можно найти в статье Е. Новоселовой, где описано формирование так называемых кластеров в области фармацевтики, о которых шла речь на форуме «Разработка и производство инновационных препаратов в России», который прошел 17–18 ноября в Москве.

Нам очень приятно сообщить нашим авторам и читателям, что наш журнал стал по-настоящему полноценным. Наши долгие усилия увенчались успехом – подписан договор с PubMed! В настоящее время идет пополнение базы данных, и вскоре, как мы надеемся, появятся сведения о публикуемых в нашем журнале статьях. Теперь основная задача редакции – стараться всячески повышать уровень публикаций с тем, чтобы в будущем «Acta Naturae» приобрел достойный импакт-фактор. Это – сложная задача, однако мы выражаем надежду, что объединенными усилиями добьемся этой цели.

**Успехов всем нам в наступающем 2011 году!
Редакционная коллегия**

Наука и технологии России – STRF.ru



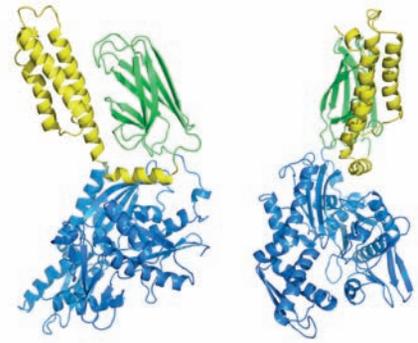
- 40% учёных согласны с тем, что публикации о результатах научной работы способствуют просвещению общества, росту престижа профессии учёного, улучшению имиджа науки
- 34% считают, что, распространяя информацию о результатах своей работы, они смогут привлечь клиентов, партнёров, деньги
- 12% надеются,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

Откройте миру свои открытия

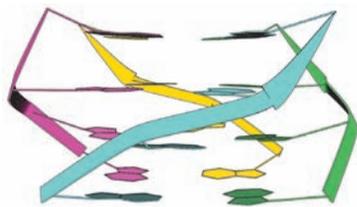
К. А. Черноризов, В. К. Швядас

Моделирование полноразмерной структуры шаперона Hsp70 человека и изучение его междоменных взаимодействий

Hsp70 – белок из класса шаперонов, принимающий участие в сворачивании *de novo* синтезированных белковых молекул, в защите гидрофобных участков денатурировавших белков, а также в регуляции апоптоза, иммунного ответа и ряда других клеточных процессов. На основании структуры отдельных доменов Hsp70 различных организмов и их элементов при помощи методов молекулярного моделирования сконструированы несколько возможных вариантов полноразмерного Hsp70 человека. Предложена схема механизма, запускающего гидролиз АТФ и приводящего к расхождению АТФ-азного и субстратсвязывающего доменов Hsp70.



Модель hHsp70_2p32 после уравнивания. АТФ-азный домен обозначен синим цветом, αSBD – желтым, βSBD – зеленым



Четырехтяжевой межмолекулярный параллельный G-квадруплекс

Р. В. Решетников, А. М. Копылов, А. В. Головин

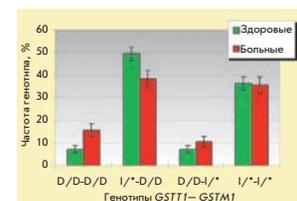
Классификация G-квадруплексных ДНК по углу вращения квадруплекса и планарности G-квартетов

Работа посвящена анализу структуры G-квадруплексных ДНК методами биоинформатики. Интерес к квадруплексным ДНК определяется их участием в функционировании теломер, онко-промоторов, возможностью создания на их основе аптамеров и наноконструкций. Разработан алгоритм общего анализа полиморфизма структуры квадруплексов из банка данных PDB с помощью оригинальных параметров. 74 структуры были сгруппированы по следующим параметрам: количество тяжей ДНК, количество квартетов, положение и ориентация соединяющих их петель. Найдена корреляция между углом поворота и напряженностью структуры квадруплексной ДНК.

Л. Е. Сальникова, Н. И. Зелинская, О. Б. Белопольская, М. М. Асланян, А. В. Рубанович

Ассоциативное исследование генов детоксикации ксенобиотиков и репарации у детей со злокачественными новообразованиями мозга

Представлены результаты исследования ассоциации аллелей генов детоксикации ксенобиотиков – *CYP1A1*, *GSTM1*, *GSTM3*, *GSTP1*, *GSTT1*, генов репарации ДНК – *XRCC1*, *XPD*, *OGG1*, гена, ответственного за метилирование ДНК, – *MTHFR* и гена нейрональной синтазы азота – *nNOS* у детей со злокачественными заболеваниями мозга (больные – 172 человека, контроль – 183). Увеличение риска заболеваемости сопряжено с минорным вариантом гена *CYP1A1* (606G, $p = 0.009$; OR = 1.50), делеционным вариантом *GSTT1* ($p = 0.013$, OR = 1.96) и достигает максимума у носителей двойных делеций *GSTT1-GSTM1* ($p = 0.017$, OR = 2.42).



Встречаемость сочетанных вариантов аллелей генов *GSTT1-GSTM1* среди больных со злокачественными новообразованиями головного мозга и в контрольной выборке

Acta Naturae

ТОМ 2, № 4 (7), ОКТЯБРЬ-ДЕКАБРЬ 2010

Учредители:

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

Редакционный совет:

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

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

Редакционная коллегия:

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

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

Руководитель проекта: Е.А. Новосёлова
Выпускающий редактор: Н.Ю. Деева
Директор по стратегическому развитию:
Е.Л. Пустовалова

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

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

Адрес редакции: 119991, Москва, Ленинские горы,
Научный парк МГУ, владение 1, строение 75Г.
Телефон/факс: +7 (495) 930 80 05.
E-mail: actanaturae@gmail.com, enovoselova@strf.ru

При перепечатке материалов ссылка на журнал
«Acta Naturae» обязательна. Любое воспроизведение опубликованных
материалов без письменного согласия редакции не допускается.
Редакция не несет ответственность за достоверность информации,
опубликованной в рекламных материалах.

© ACTA NATURAE, 2010

Номер подписан в печать 15 декабря 2010 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

Техплатформа: объединить
усилия, наладить диалог 6

Национальные технологические
платформы. Европейский опыт 12

Фармацевтические кластеры как лекарство
для региональной экономики 14

ОБЗОРЫ

В. А. Степанов
Геномы, популяции, болезни:
этническая геномика
и персонифицированная медицина 18

А. П. Соколенко, А. Г. Иевлева, Н. В. Митюшкина,
Е. Н. Суспицын, Е. В. Преображенская,
Е. Ш. Кулигина, Д. А. Воскресенский, О. С. Лобейко,
Н. Ю. Крылова, Т. В. Городнова, К. Г. Буслов,
Е. М. Бит-Сава, Г. Д. Долматов, Н. В. Порханова,
И. С. Поляков, С. Н. Абышева, А. С. Катанугина,
Д. В. Бахолдин, Г. А. Янус, А. В. Того,
В. М. Моисеенко, С. Я. Максимов, В. Ф. Семиглазов,
Е. Н. Имянитов

Синдром наследственного
рака молочной железы и яичников
в Российской Федерации 35

СОДЕРЖАНИЕ

Е. В. Дементьева, С. М. Закиян

Дозовая компенсация генов половых хромосом у эукариот 40

Е. Р. Галимов

Роль p66shc в окислительном стрессе и апоптозе 49

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

М. В. Загоскин, Т. Л. Маршак, Д. В. Муха, А. К. Гришанин

Диминуция хроматина регулирует число генов рРНК у веслоногих раков 58

Л. Е. Сальникова, Н. И. Зелинская, О. Б. Белопольская, М. М. Асланян, А. В. Рубанович

Ассоциативное исследование генов детоксикации ксенобиотиков и репарации у детей со злокачественными новообразованиями мозга 65

К. А. Черноризов, В. К. Швядас

Моделирование полноразмерной структуры шаперона Hsp70 человека и изучение его междоменных взаимодействий 74

Р. В. Решетников, А. М. Копылов, А. В. Головин

Классификация G-квадруплексных ДНК по углу вращения квадруплекса и планарности G-квартетов 80

А. В. Максименко, А. В. Ваваев, Л. И. Бурячковская, В. П. Мох, И. А. Учитель, В. Л. Лакомкин, В. И. Капелько, Е. Г. Тищенко

Биофармакология ферментных конъюгатов: вазопротекторная активность супрамолекулярного производного супероксиддисмутаза-хондроитинсульфат-каталаза 90

С. С. Шишкин, Л. И. Ковалев, М. А. Ковалева, И. Н. Крахмалева, К. В. Лисицкая, Л. С. Еремина, А. В. Иванов, Е. В. Герасимов, Э. Г. Садыхов, Н. Ю. Уласова, О. С. Соколова, И. Ю. Торопыгин, В. О. Попов

База данных «Протеомика рака простаты» 104

А. Н. Глушков, С. В. Апалько, М. Л. Филипенко, В. А. Матвеева, А. Ю. Бакулина, В. Г. Лунин, М. В. Костянко

Новый подход к созданию антиканцерогенных вакцин 115

Правила для авторов 2011 122

Техплатформа: объединить усилия, наладить диалог

Марина Муравьева

В России приступили к формированию перечня технологических платформ (ТП). Они должны стать инструментом, который сократит разрыв между наукой и индустрией, повысит инновационную активность предприятий и позволит сосредоточить госфинансирование на тех исследованиях и разработках, которые востребованы бизнесом. Минэкономразвития собирает заявки от инициаторов создания ТП, и по итогам экспертного отбора правительство определит их количество.

С формальной точки зрения за формирование федерального перечня технологических платформ отвечает рабочая группа правительственной комиссии по высоким технологиям и инновациям, руководит которой заместитель министра экономического развития **Андрей Клепач**. Идея о формировании технологических платформ пришла в Россию из Европейского Союза, где эти площадки действуют уже несколько лет. За нормативную базу процесса отвечают Минобрнауки и Минэкономразвития России, достаточно активно в подготовке перечня участвует и Минпромторг России. Руководство страны рассматривает ТП как инструмент объединения усилий государства, бизнеса и науки в определении инновационных вызовов, выработке и реализации долгосрочных научно-технологических приоритетов в масштабах отдельных секторов экономики, на стыке разных отраслей.

Итак, понятие «техплатформа» уже давно фигурирует в документах Европейской Комиссии. И то, что в России решили создать нечто похожее, надо при-

ветствовать и поддерживать, считают специалисты. Необходимо собрать на одной площадке представителей бизнеса и исследователей, чтобы между ними завязался диалог, определились точки соприкосновения, общие интересы. Именно в таком ключе формировались техплатформы

СПРАВКА:

Правительство понимает под «технологической платформой» коммуникационный инструмент, направленный на активизацию усилий:

- по созданию перспективных коммерческих технологий, новых продуктов/услуг,
- по привлечению дополнительных ресурсов для проведения исследований и разработок с участием всех заинтересованных сторон (бизнеса, науки, государства, гражданского общества),
- по совершенствованию нормативно-правовой базы в области научно-технологического и инновационного развития.

в ЕС. Как следствие – направления исследований многих научных групп Европы оказались сфокусированы на потребностях внутреннего потребительского рынка.

В России ТП должны решить несколько важнейших задач, и в первую очередь – повысить инновационную активность предприятий. Об этом заявил замминистра экономического развития **Андрей Клепач** на заседании правительственной комиссии в начале августа. Создание техплатформ – закономерный шаг в развитии частного-государственного партнерства в сфере исследований и разработок, инноваций и высоких технологий. В рамках ТП удастся выявлять заинтересованность будущих потребителей в создаваемых технологиях, что позволит на более выгодных условиях привлекать средства из частных источников. Это, кстати, еще одна задача, которую в правительстве собираются решить с помощью ТП – сосредоточить госфинансирование на тех исследованиях и разработках, которые востребованы бизнесом. Это крайне важно, учитывая, что в стране перекошена структура национальной инновационной системы. Основным заказчиком и плательщиком инновационного развития является государство: оно вкладывает около 70 процентов инвестиций и только 30 – частный бизнес. Чтобы изменить эту ситуацию, правительство запускает процесс «принуждения к инновациям», обязывая компании (пока толь-



Академик Алексей Хохлов

ко с госучастием) сформировать планы своего инновационного развития. По всей вероятности, те платформы, которые войдут в федеральный перечень ТП, будут взаимосвязаны с этими планами.

ГОСФИНАНСИРОВАНИЕ – ЧЕРЕЗ ПЛАТФОРМЫ

Новая инициатива правительства – создание ТП – вызвала оживленный интерес у профессионального сообщества. И это вполне объяснимо: предполагается, что через некоторое время серьезные бюджетные деньги будут выделяться только через ТП.

«Технологические платформы рассматриваются правительством как один из важных элементов реформы научно-прикладной сферы, – комментирует проректор Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова по инновациям академик **Алексей Хохлов**. – В частности, предполагается, что большая часть финансирования, которое будет выделяться на прикладные

проекты, пойдет через технологические платформы».

ТП следует рассматривать как некую глобальную экспертную площадку, которая будет определять, какие направления акцептованы бизнесом и научным сообществом. Задача техплатформ – помочь ученым формализовать свои проекты, описать их на понятном для бизнеса языке. «Если в России технологические платформы создаются по подобию европейских, значит, это будут структуры, которые выдают определенный набор документов, форсайтов, неких предложений и планов. Платформа советует. Это большой коллективный разум», – поясняет **Владимир Попов**, директор Института биохимии им. А.Н. Баха РАН.

Платформ будет много, и каждая из них будет конкурировать за получение финансирования под свои темы. Государством определены несколько приоритетов, остальные направления смогут получать деньги только в том случае, если самоорганизо-

СПРАВКА:

Цели российских ТП:

- технологическая модернизация экономики,
- повышение конкурентоспособности отдельных отраслей,
- снижение ресурсоемкости сырьевых секторов,
- решение значимых социальных проблем (здоровье, безопасность, экология, образование, культура),
- стимулирование развития новых рынков высокотехнологичной продукции и соответственно новых компаний в этих сферах.

вавшееся экспертное сообщество окажется достаточно представительно и сможет убедительно отстаивать свои интересы.

«Мне пока многое непонятно в работе технологических платформ, – признается академик **Всеволод Ткачук**, декан факультета фундаментальной медицины МГУ. – Но я думаю, что успех будет зависеть от того, какие удастся привлечь коммерческие структуры и научные коллективы. Сможет ли техплатформа завоевать авторитет, а соответственно влиять на объявление конкурсов под финансирование проектов. В прошлые годы конкурсы объявлялись с помощью другого механизма, и подчас было непонятно, почему государство считает важным именно то или иное направление. А тут у властей появится объяснение, что это не ими придумано, что не зашел человек в кабинет, а технологическая платформа предложила. И у каждого ученого – участника техплатформы появится возможность убедить коллег в том,

что эту тему надо объявить. Мне кажется, это был бы еще один важный для поддержки научных проектов механизм».

Примерно год или два будет длиться переходный период, пока платформы будут формироваться. В это время будет действовать некий иной инструмент распределения финансирования.

КАК ВЫБИРАТЬ ПРИОРИТЕТЫ

Если учитывать европейский опыт, то можно выделить три стадии развития платформ. На первой формулируется концепция: почему в данной области нужна ТП. В Европе все они инициированы крупным бизнесом. На второй определяется стратегический план исследований и разработок, которые необходимо развивать. На третьей решается, как будут трансформированы исследования и разработки, каких результатов удастся добиться по итогам 3–7 лет выполнения профинансированных с подачи платформы проектов.

Главный вопрос, порождающий много споров при обсуждении российских ТП, связан с выбором приоритетов. **Михаил Пучков**, замначальника отдела Департамента приоритетных проектов науки и технологий Минобрнауки РФ считает, что важно не замыкаться на решении мелких отраслевых задач. В экономике границы между отраслями все сильнее размываются, поэтому в основе ТП должны лежать межотраслевые проблемы. Но какие именно?

«Я представляю себе технологические платформы как гигантскую воронку, которая вовлекает в себя огромное количество ресурсов, а значит, отнимает их от других интересных программ, – говорит **Александр Смирнов**, генеральный директор Ассоциации организаций оборонно-промышленного комплекса производителей медицинских изделий и оборудования. – Не получится ли так, что, создавая ТП, Россия отстанет

по многим стратегически важным направлениям. Только потому, что в сферу внимания платформ не попадут перспективные разработки?»

Эксперты и инициаторы первых ТП соглашаются, что подобные риски всегда возникают при выборе приоритетных направлений. Но при этом уверены, что участие представителей бизнеса в этом процессе как минимум вдвое снизит риски. Кроме того, нужно тщательно формировать экспертные группы ТП – это будет первым этапом создания платформ. К этому процессу нужно подходить особенно тщательно. Перед экспертами стоит задача определить, какие базовые технологии лягут в основу ТП. Их строго ограниченный перечень будет зафиксирован в паспорте платформы. Благодаря грамотной и слаженной работе экспертов платформ удастся устранить дублирование исследований, финансируемых из разных источников.

Алексей Конов, исполнительный директор ГК «Биопроцесс»



Моя точка зрения, что каждый понимает под платформой «свое»: сотрудники РАН и вузов – очередной источник денег типа ФЦП, чиновники в министерствах – смесь форсайта и попытку заинтересовать профильный бизнес, и т.д. А на самом деле – платформа, на мой взгляд, это прежде всего определение окна возможностей на завтра и последовательных шагов для того, чтобы успеть в него «войти». По поводу ТП «Постгеномные и клеточные технологии в биологии и медицине» – есть несколько простых вещей, которыми она должна заниматься:

Определить направления развития биотехнологий в глобальном масштабе на 20 лет и выбрать приоритетные для России.

Определить лучшие из существующих ключевых компетенций в России, а также отсутствующие и слабо развитые.

Сформировать предложения по поддержке выбранных лучших, по перепрофилированию, усилению или закрытию слабых и при необходимости – по развитию с нуля отсутствующих.

Сформировать предложения по изменению законодательной и регуляторной базы, чтобы свободно и прозрачно развивать выбранные компетенции.

Помощь в формировании, «упаковке» лучших из компетенций в конкретные проекты, помощь во «встрече» проектов и инвесторов, ведение проектов после инвестирования, лоббизм поддержанных проектов.

Выделить компетенции (люди, научные группы), которые не могут сегодня быть сформированы как проекты, но являются передовыми по своей научной сути и могут дать прорывные результаты через несколько лет. Помощь таким проектам возможна через формирование среды максимального благоприятствования – финансового (гранты, невозвратные ссуды и проч.) и организационного (создание лабораторий под лидеров проектов в институтах РАН, РАНХ, вузах).

ПЕРВЫЕ ИНИЦИАТИВЫ

Принципы формирования тех-
платформ:

- четкая направленность на интересы общества, бизнеса, государства;
- значимое представительство бизнеса (не менее 50 процентов);
- средне- и долгосрочно ориентированные проекты;
- формирование учебных программ для подготовки и переподготовки кадров;
- ориентация на расширение кооперации, открытость, публичность.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова в рамках программы развития инновационной структуры, которая была разработана по 219-му постановлению правительства, выступил координатором создания четырех технологических платформ. Этой работой в вузе начали заниматься еще весной. Как подчеркнул Алексей Хохлов, МГУ в данном случае игра-

ет лишь координирующую роль, никаких «главных» или «неглавных» участников в технологической платформе нет. Все равны. Техплатформа представляет собой добровольное объединение организаций любой формы собственности, государственных и негосударственных учреждений, профессиональных объединений, ассоциаций, специалистов, разделяющих цели и задачи платформы. Вопрос вхождения организации в техплатформу пока не юридический. Кроме того, создание ТП – процесс динамический, а списки участников открыты и будут формироваться.

Первая из предложенных ТП – «Стратегические информационные технологии». В рамках этой платформы определено несколько крупных разделов. Один из них посвящен созданию новых компьютерных архитектур для вычислителей экзафлопного поколения (следующая мощность вычислений). Второй – гибридным архитектурам. Третий – ин-

женерным расчетам, например при проектировании различных механизмов. Остальные направления связаны с конкретными отраслями, в частности с фармакологией (созданием новых физиологически активных веществ); нефтегазовой промышленностью, материаловедением (расчеты характеристик материалов на основе молекулярной структуры).

Вторая ТП – «Наноматериалы для энергоэффективности». Речь идет о солнечных батареях, топливных элементах, новых типах батарей и накопителях энергии, материалах для «умного дома», а также полимерных нанокомпозитах для транспорта, которые позволят сделать электромобили или самолеты более легкими.

Еще две платформы связаны с биологическим направлением, которое сейчас находится на подъеме и очень быстро развивается.

Идея создания платформы «Постгеномные и клеточные тех-

Александр Габиров, профессор, член-корр. РАН

Формирование новых структур, или новых «коммуникационных инструментов», имеет смысл лишь в том случае, если не работают старые или требуется их кардинальное совершенствование. Абсолютно очевидно, что новая форма, действительно получившая развитие относительно недавно на Западе, может привести к созданию новых продуктов, но лишь в случае, если *три основные компоненты*, а именно наука, производство и менеджмент, будут одинаково квалифицированно подходить к решению поставленных проблем. Лишь равновеликость развития этих трех компонент может обеспечить устойчивый рост экономики, в противном случае идея платформ будет дискредитирована. К сожалению, предпосылки для такого пессимистического прогноза есть. Если уровень научных исследований в России, постоянно подвергающийся критике, может быть в каждом конкретном случае



оценен с использованием международно признанных параметров, то с двумя другими компонентами дела обстоят существенно хуже. Уровень нашего бизнеса, если говорить о биотехнологическом, крайне низок, а менеджмент не выдерживает критики. Результаты научных разработок могут быть выбраны вполне осознанно. А вот кадры, ушедшие в биотехнологический бизнес, в большинстве своем собраны из бывших ученых-неудачников, не прошедших высококвалифицированную подготовку в серьезных международных центрах по работе с персоналом. К сожалению, это положение становится очевидным на разного рода научно-практических конференциях, семинарах, форумах, выставках. Люди занимаются продвижением давно известных продуктов, даже близко не относящихся к категории инновационных. Лишь грамотное решение кадровых вопросов, связанных с обучением организаторов производства, инженеров-биотехнологов и менеджеров биотехнологических производств, знающих производство не понаслышке, может обеспечить реализацию программы по технологическим платформам.

нологии в биологии и медицине» возникла всего пару месяцев назад. За это время была проделана огромная работа. Инициативная группа провела опрос экспертов, которые рекомендовали участников ТП и обозначили основные проблемы. Был подготовлен меморандум, под которым подписались 20 компаний. Цели данной ТП – научно-технологическое и инновационное развитие постгеномных и клеточных технологий для обеспечения устойчивого развития экономики России; совершенствование нормативно-правового регулирования в этой области; консолидация российского медицинского и биотехнологического сообщества; отстаивание его интересов. Цель на ближайшее время – войти в перечень ТП РФ.

Техплатформу «Промышленные биотехнологии и биоэнергетика» инициировала ГК «Ростехнологии». О ее значении рассказал Владимир Попов: «В России отсутствуют какие-либо официальные документы высокого уровня, регламентирующие развитие биотехнологий, в то время как весь мир озабочен

созданием биоэкономики, которая должна изменить XXI век. По оценкам экспертов, до трех процентов ВВП развитых стран будет производиться за счет биотехнологий».

По словам Попова, Россия потеряла свою биотехнологическую экономику за последние 20 лет, хотя в доперестроечные годы находилась на втором месте после США. Сейчас на «международном рынке занимает *n* место с мизерным рынком в 2 млрд долларов» (это 0.2% от мирового).

Участники техплатформы ставят перед собой задачи запустить процесс развития этого направления. «Наша цель – консолидация биотехнологического сообщества и цивилизованное лоббирование его интересов на всех уровнях власти», – говорит Владимир Попов. На сегодняшний день в состав участников ТП вошли около 30 организаций. Разработан меморандум. Следующие шаги – расширить количество участников, определить возможные источники финансирования и подготовить концепцию развития, а также войти в федеральный перечень ТП России.

СКОЛЬКО БУДЕТ ПЛАТФОРМ

В настоящее время формируется федеральный перечень ТП. Известно, что в первую очередь их создадут по приоритетным направлениям технологического развития, зафиксированным в Концепции долгосрочного развития России до 2020 года. Среди них: создание новых поколений авиационной техники и энергоэффективных двигателей; сооружение атомных электростанций повышенной безопасности; развитие водородной энергетики и производство новых моторных топлив; развитие оптоэлектроники и микромеханики; разработка специальной техники для Арктики и экстремальных сред; разработка новых технологий обработки металлов.

До 25 ноября Минэкономразвития принимало от инициативных групп предложения по созданию платформ. После того как их рассмотрят в ведомствах, одобренные проекты представят на утверждение рабочей группе правительственной комиссии. Сколько в конечном счете отберут платформ, пока официально не объявляется. В экспертных кругах говорят о 10–15. ●

Акция! Один номер бесплатно

Самоорганизующиеся структуры и
наносборки

Наноэлектроника

Устройства и изделия на
основе наноматериалов
и нанотехнологии

Исследования
наноуглерода

Подписка в редакции:

Телефон/ факс:

+7 (495) 930 88 06

E-mail: podpiska@nanorf.ru

Web-site: www.nanorf.ru

Каталоги Роспечати (индекс 59880)
и «Пресса России» (индекс 42368)

www.nanorf.ru

Российские нанотехнологии - ведущий* научный журнал

* по данным расчёта импакт-фактора за 2008 год (elibrary.ru; данные ИФ РИНЦ от 16.06.2009 г.)

Национальные технологические платформы. Европейский опыт

Иван Стерлигов

Минобрнауки РФ объявило о начале формирования национальных технологических платформ – тематических объединений бизнеса, науки и государства, призванных обеспечить согласованное инновационное развитие по ключевым экономическим направлениям. Механизм работы платформ заимствуется у ЕС.

Принципиальная проблема научно-технического прогресса – координация его участников. Жизнь общества улучшается или разнообразится только тогда, когда научные идеи превращаются в технологии, а те находят выгодное применение. В обычном состоянии науку, разработки и технологический бизнес можно уподобить лебедю, раку и щуке: шансы на то, что все они двинутся в одну сторону, очень невелики. Ученые, инженеры и менеджеры преследуют разные цели и по-разному оценивают достижения друг друга. Чтобы прогресс все-таки был, необходимо обеспечить согласованную работу всех трех групп.

Современная экономическая теория описывает это согласование с помощью концепции *Национальной инновационной системы* (НИС), разработанной в конце 1980-х гг. англичанином Кристофером Фрименом и датчанином Бенгт-аке Люндвалом. Теория НИС фактически лежит в основе всего плана развития Евросоюза, а сами Фримен и Люндвал были в числе вдохновителей известной Лиссабонской стратегии ЕС.

Согласно определению Фримена, НИС – это *сеть организаций частного и государственного секторов экономики, чьи действия и взаимодействия инициируют, импортируют, меняют и распространяют новые технологии*. Так как экономики большинства стран ЕС принадлежат к смешанному, социалистически-капиталистическому типу, роль государства в европейской моде-

ли НИС особенно велика. Евросоюз является ключевым заказчиком и потребителем исследований и разработок, финансируя их через свои рамочные программы.

Нынешняя, Седьмая рамочная программа (РП7) рассчитана на 2007–2013 гг. В качестве самых общих инструментов координации в ней, как и в российских программах, выделены тематические приоритетные направления, их десять. Больше всего средств идет на ИТ, здравоохранение, транспорт и нанотехнологии.

Но основным инструментом координации усилий всех игроков на поле R&D служат *Европейские технологические платформы*. Формально они не включены в РП7, но работают в тесном контакте с ней. Таких платформ 36, первая из них возникла в 2002 г.

Каждая платформа создана вокруг отдельной группы коммерчески и социально значимых технологий – «Фотовольтаика», «Водоснабжение и санитарные технологии», «Промышленная безопасность», «Текстиль и одежда будущего». В ЕС принято считать, что платформы возникают «снизу», но на деле бизнес, инвестиционно-финансовые, исследовательские и общественные организации формируют их в тесном контакте с правительственными агентствами и службами.

Юридического статуса у технологических платформ нет, это открытые сетевые организации, формализующие отраслевые НИС. Их существование подчинено трем фазам:

1. Заинтересованные участники путем встреч и переговоров формируют общее видение развития предметного поля, вокруг которого они объединились.

2. Совместными усилиями, но под руководством компаний промышленности формируется *Стратегический план исследований*. В этом плане говорится, какие средне- и долгосрочные исследования и разработки требуется провести.

3. Идет выполнение стратегического плана с привлечением частных и государственных инвесторов (например, через РП7 или национальные министерства и фонды).

Одна из основных задач платформ – помогать чиновникам ЕС в формировании тематики конкурсов в РП7. При этом ЕС финансирует лишь работу секретариатов платформ, а основные организационные расходы ложатся на плечи участников. Дополнительно Евросоюз следит за тем, чтобы концепция платформ не размылась. Соответствующий статус «Европейской платформы» присваивается только сплоченным и мотивированным объединениям, возникшим вокруг прорывных технологических направлений.

Для примера обратимся к стратегическому плану технологической платформы «Европейский совет по исследованиям в области дорожного транспорта». Вот лишь некоторые пункты плана:

– в 2020–2025 гг. будут проведены полноценные рабочие испытания систем автоматического дорожного движения, синхронного тор-

можения и разгона автомобилей, соблюдения дистанции;
 – в 2010–2015 гг. пройдут эксперименты по обоснованию возможности прямого измерения трения автомобильных шин;
 – в 2010–2015 гг. будут разработаны полноценные системы сетевых коммуникаций автомобиль-автомобиль и автомобиль-инфраструктура.

Задолго до официального принятия план размещают на сайте платформы в свободном доступе и объявляют прием отзывов.

В состав платформы входят полтора десятка профильных ассоциаций бизнеса (Ассоциация асфальта, Ассоциация поставщиков автомобильных компонентов и др.), несколько университетов и некоммерческих фондов, страны ЕС, Еврокомиссия в целом и ее отдельные комитеты. Особую роль играют корпорации – Bosch, Renault, Volvo и прочие.

Общее управление платформой ведет исполнительный совет из пяти человек, возглавляемый Вольфгангом Штайгером, директором отдела новых технологий Volkswagen Group. Совет собирается примерно раз в месяц, а более представительные встречи основных членов обычно приурочены к профильным выставкам и конференциям.

Платформы находятся на разных стадиях развития. Отдельную группу составляют самые продвинутые и требующие особенно сложных и дорогих исследований объединения. Для них в РП7 разработан механизм Совместных технологических инициатив (СТИ). На сегодня таких инициатив пять, все они действуют в партнерстве со своими «родительскими» платформами: «Топливные элементы и водородная энергетика», «Технология наноэлектроники», «Инновационные лекарства», «Встраиваемые электронные системы» и «Аэронавтика и воздушный транспорт».

Юридически это частно-государственные партнерства, в каждое из которых входят Еврокомиссия, заинтересованные страны и представители частного бизнеса, объединившиеся в ассоциацию. ЕС выделяет каждой СТИ в среднем 1–2 млрд евро на срок до 2013 г., столько же дает бизнес. На открытом конкурсе выбираются проекты для финансирования, объединяющие научные центры, малые компании и корпорации. Главным критерием отбора служит научное превосходство. Первые проекты были отобраны в конце 2008 г., поэтому пока об эффективности СТИ говорить рано.

Зато уже есть достаточно результатов мониторинга работы обычных технологических платформ. В 2008 г. опрос представителей 950 организаций-участников платформ показал, что в целом они замечают усиление координации и довольны возможностями согласования стратегии. Дает ли участие в платформе доступ к финансовым ресурсам? Да, считают респонденты, но степень оптимизма по этому вопросу гораздо выше у чиновников, чем у менеджеров корпораций, университетских профессоров и особенно владельцев малых инновационных фирм.

Есть проблемы в интеграции с РП7. Если представители одних платформ довольны тем, как их предложения отражены в конкурсах программы, то другие считают, что их совершенно игнорируют. Есть жалобы на то, что усилия по составлению и продвижению стратегического плана исследований совершенно не соответствуют успеху в РП7 – конкурсы выигрывает такая же малая часть заявок, что и раньше.

Эксперты ЕС столкнулись с большими трудностями, когда пытались получить информацию о деятельности отдельных платформ. Порой их секретариаты работали плохо, а члены встречались для обсуждений очень редко.

Наконец, не оправдалась надежда на то, что платформы будут формировать и развивать профессиональное образование. В этой сфере активности практически нет. Но в целом 93% респондентов сообщили, что они бы не изменили своего решения о вступлении в платформы, если бы знали заранее об их развитии. Исследование 2009 г. подтвердило вывод о полезности техплатформ, но подчеркнуло недостаточную степень вовлеченности участников в их работу. Из-за неформального характера деятельности платформ каких-то прямых экономических и статистических эффектов от их существования не фиксируется.

Умеренный успех технологических платформ сочетается с общими скромными достижениями европейской научно-инновационной политики. Ключевая цель Лиссабонской стратегии – доведение расходов на науку к 2010 г. до 3% ВВП – осталась нереализованной. Теперь эксперты Еврокомиссии создают новую стратегию. Технологические платформы будут сохранены, но им рекомендовано сливаться в «технологические инновационные платформы», организованные в форме кластеров.

Помимо стратегических планов участникам теперь предписано разрабатывать и сдавать в Еврокомиссию «Планы по инновационным действиям», а также проводить согласованные с ЕС прогнозные исследования. Они должны будут сами оценивать поступающие высокорисковые проекты и реализовывать собственные «Программы внедрения инноваций». Насколько оправданной окажется стратегия такого усиления функционала платформ, покажет время. Евросоюз от них отказываться не собирается, а еврочиновники настаивают, что этот механизм обладает огромным потенциалом, говоря о платформах как о «флагманах Европы». ●

Фармацевтические кластеры как лекарство для региональной экономики

Елена Новосёлова

В России активно идет процесс создания фармацевтических кластеров. Есть реально заработавшие, есть проектные, пока на бумаге. Везде звучат оптимистические отчеты: регионы поднимают производство, уровень образования населения, получают новые рабочие места, а компании-фармпроизводители — готовую инфраструктуру и налоговые преференции. А ждать ли развития инновационной среды в рамках создаваемых фармацевтических кластеров? Этот и другие вопросы обсуждались на форуме «Разработка и производство инновационных препаратов в России», который прошел 17–18 ноября в Москве. Организатором выступил Институт Адама Смита.

Кластер — это отраслево-территориальное добровольное объединение предпринимательских структур, которые тесно сотрудничают с научными учреждениями, общественными организациями и органами местной власти с целью повышения конкурентоспособности собственной продукции и содействия экономическому развитию региона.

В настоящее время на территории России создается все больше и больше кластеров в различных отраслях: машиностроении и металлообработке, авиационно-космическом строении, судостроении, ИТ, оптоэлектронике, приборостроении, лесопереработке, агропромышленности и сельском хозяйстве, фармацевтике и т.д. О формировании фармацевтических кластеров заявили Санкт-Петербург, Москва, Московская, Ярославская, Калужская, Свердловская области, Сибирский регион, Ставропольский край, Республика Татарстан.

Пока вопросов больше, чем ответов: есть ли в регионе предпосылки для создания фармкластера, найдет ли он резидентов, какое производство должно быть в фармкластере (лекарства собственной разработки, дженерики

и просто упаковка лекарственных препаратов), как развивать направление инновационных разработок, как участвовать в образовательных программах, решат ли фармкластеры задачи по импортозамещению лекарственных препаратов, каковы аспекты правового обеспечения, как оценивать эффективность кластера и сколько фармацевтических кластеров нужно России?

На территории фармкластера должна проходить вся цепочка разработки и производства лекарств. Лишь немногие из регионов могут говорить о создании на их территории полноценных кластеров со структурой «подготовка кадров — R&D — производство». Скорее, пока в России речь идет о специальных экономических зонах, на которые активно приглашается фармпроизводство по причине привлекательности фармацевтического рынка (показавшее рост даже в период кризиса) и активной поддержки государства (стратегия «Фарма-2020»).

Как и прогнозировалось, только отечественными компаниями фармкластер не наполнить. Кроме того, привлечение иностранных компаний необходимо для обеспечения трансфера технологий

и специалистов не только в области изготовления лекарственных средств, но и для R&D. Немного утешает, что в проекты по созданию фармацевтических кластеров со стороны производителей включились действительно крупные игроки международного фармбизнеса. Примером фармацевтического кластера, соответствующего своему определению и сумевшего привлечь серьезных участников, является Ярославский кластер фармацевтической промышленности и инновационной медицины. Одним из резидентов данного фармкластера стала швейцарская компания «Новартис Фарма» (Novartis Pharma), руководитель российского подразделения которой г-н Хари Свен Кришнан и губернатор Ярославской области Сергей Вахруков подписали 7 сентября 2010 года Меморандум о взаимопонимании между Правительством Ярославской области и компанией «Новартис Фарма» по сотрудничеству в области здравоохранения и медицинской науки. Согласно Меморандуму планируемое сотрудничество будет развиваться в двух направлениях: повышение квалификации профессиональных кадров в сфере здравоохранения и исследование инновационных препаратов, в частности увели-

чение числа клинических исследований и подготовка кадров для их проведения. С этой целью в регионе в 2011 году на базе Ярославской государственной медицинской академии компания «Новартис Фарма» планирует создать Центр клинических исследований. Сотрудничество в проведении научно-клинических исследований в Ярославской области успешно осуществляется уже в течение 7 лет. За это время, благодаря партнерству с компанией «Новартис Фарма», ведущие академические и лечебные учреждения региона получили возможность участвовать в 17 международных клинических исследованиях по 14 показателям.

Для подготовки кадров для реализации инновационного развития в области фармакологии и медицины в Ярославской области формируется межвузовский научно-образовательный инновационный центр, который объединил ведущие учебные организации региона. Кроме того, на базе учебных заведений запускаются специальные программы подготовки персонала для фармацевтической промышленности. Так, компания «Новартис Фарма» приступила к реализации совместной образовательной программы с Ярославской государственной медицинской академией, которая включает не только специальную программу подготовки кадров для медицины и фармацевтики, стажировки выпускников на предприятиях компании, но и программу подготовки педагогических кадров. Компания «Никомед» (Nucomed) совместно с ЯМГА и Ярославским техническим университетом на базе химико-технологического лицея запустила программу подготовки технического персонала для нужд фармацевтической промышленности. Первая группа учащихся из 25 человек начала обучение

с 1 сентября 2010 года по трем рабочим специальностям.

Кроме того, компания «Никомед» в июне 2010 года начала в регионе строительство завода, на котором планируется выпускать препараты для лечения и профилактики неврологических и кардиологических заболеваний. Компания инвестировала в строительство 75 млн евро и рассчитывает начать выпуск готовой продукции уже в 2014 году. На территории Ярославской области также реализуются проекты создания высокотехнологичных производств компании «Р-Фарм» и Центра высоких технологий «ХимРар», которые объявили о строительстве в Ярославле совместного предприятия по производству активных субстанций лекарственных препаратов. Проект, получивший рабочее название «Фармославль», нацелен на снижение зависимости отечественного здравоохранения от импорта не только готовых лекарственных форм, но и субстанций для их производства.

В рамках данного фармацевтического кластера планируется строительство первого в России завода по производству противогриппозных вакцин на основе нанотехнологий. Инвесторами проекта выступили ГК «Роснано» и ООО «НТ Фарма» (чтобы избежать задержек с аудиторскими процедурами, а также чтобы «Роснано» могло иметь 49 процентов в уставном пакете предприятия, было решено организовать новую компанию «НТ Фарма», а не включать завод по производству нановакцин в состав уже существующей фирмы «Иммафарма»). Первоначально инвестиции «Роснано» составили 1.5 млрд рублей, однако планируется дальнейшее привлечение средств за счет выпуска нановакцин и от свиного гриппа.

Еще один пример отраслевого территориального объединения образовательных, научных и про-

изводственных организаций в области фармацевтики – Калужский фармацевтический кластер.

Еще в 2006 году в городе Обнинске Калужской области был открыт российский завод компании Nemofarm (входящий в немецкую группу STADA), обладающий максимальной мощностью производственной площадки до 2.5 млрд таблеток в год. Общая сумма инвестиций в строительство составила 32 млн евро. О строительстве собственного производства в этом регионе заявила датская компания «Ново Нордиск» (Novo Nordisk). В соответствии с меморандумом о намерениях, подписанным компанией «Ново Нордиск» и Правительством Калужской области, общий объем инвестиций в строительство завода по производству инсулина составит 80–100 млн долларов США. Соглашение определяет обязанности сторон по обеспечению инфраструктуры, необходимой для строительства завода (электросети, газо- и водоснабжение, дороги и т.д.), и основные условия приобретения компанией земельного участка для строительства завода. Также соглашение о строительстве собственного производства на территории Калужской области подписала фармкомпания Berlin-Chemie AG, входящая в объединение «Группа Менарини» (Menarini Group). На первом этапе реализации проекта с общим объемом инвестиций в 30 млн евро в Калуге будет запущена линия упаковки (2013 год), позже – производство лекарственных средств (2014 год).

Еще две российские фармацевтические компании в сентябре 2010 года объявили о строительстве производства на территории Калужской области – это ЗАО «Фарм-Синтез» и «НИАРМЕДИК ПЛЮС». «Фарм-Синтез» планирует организовать на заводе выпуск онкологических и диагностических лекарственных препаратов по полному циклу (производство

и упаковка) из субстанций собственного производства. Завершение проекта намечено на лето 2011 года. Суммарный объем инвестиций в данный проект до 2012 года составит около 10 млн евро полностью за счет средств компании. Компания «НИАРМЕДИК ПЛЮС» планирует создание производства полного цикла, направленного на обеспечение спроса двух ключевых фармацевтических препаратов компании «НИАРМЕДИК ПЛЮС» – индуктора интерферона противовирусного действия и коллагенового материала, применяемого в хирургии, травматологии, ортопедии.

В формировании фармкластера в Калужской области участвует Фонд посевных инвестиций Российской венчурной компании, который для своих первых инвестиций выбрал проекты, разработанные в Калужской области. Это система диагностики инфаркта миокарда «Кардиомаркер» (проект ООО «Обнинская фармацевтическая компания») и лекарство от рака почек (проект ООО «ОнкоМакс»).

Огромное значение в переходе от индустриальных парков к территориальным кластерам придается развитию образовательных программ и подготовке кадров для отрасли, локализации на территории фармкластера R&D, созданию центров клинических испытаний. В рамках программы по созданию фармкластера в Обнинске несколько лет назад был открыт медицинский факультет при Обнинском государственном техническом университете атомной энергетики (ИАТЭ) (филиал Национального исследовательского ядерного университета МИФИ).

На территории Калужской области был создан Центр по подготовке специалистов для фармацевтической промышленности, который сотрудничает с Берлинским Центром профессионального обучения, специализирующегося

в фармацевтической и химической промышленности, РУДН, Международной фармацевтической федерацией. В Центре с 1 сентября 2011 года стартует более 20 программ обучения, в которых будет участвовать 300 человек.

В своем докладе на форуме «Разработка и производство инновационных препаратов в России» министр экономического развития Калужской области **Руслан Заливацкий** отметил, что Правительство Калужской области создало все условия для комфортного развития инвестиционных проектов. Так, созданные индустриальные парки предоставляют компаниям готовую инженерную и логистическую инфраструктуру, земля сдается в аренду или под продажу, есть готовые производственные площади со структурой для долгосрочной аренды. Результатами такой политики в рамках региона стали 56 активно работающих инвестиционных проектов, а до конца 2010 года планируется запустить еще 5.

Концепция развития фармацевтического кластера в Санкт-Петербурге была утверждена постановлением Правительства Санкт-Петербурга от 22 апреля 2010 года № 419. В Санкт-Петербурге имеются все необходимые составляющие для развития фармацевтической отрасли в новом формате. Это наличие научного и кадрового потенциала, научно-исследовательские институты, разработчики лекарственных препаратов – 11 академических институтов в области химии и медицины, большая клиническая база. Сегодня в Петербурге имеется порядка десяти крупных и средних предприятий, выпускающих широкий спектр лекарственных препаратов. По словам губернатора Валентины Матвиенко, проекты, связанные с фарминдустрией, будут иметь приоритетное значение для экономики города и полу-

чат поддержку от Правительства Санкт-Петербурга. Для координации работы по реализации концепции создан Межвузовский научный центр, который объединил Санкт-Петербургский государственный технологический университет, Санкт-Петербургский медицинский университет им. И.П. Павлова и Санкт-Петербургскую государственную химико-фармацевтическую академию.

Пока процесс формирования фармацевтического кластера начался с создания особой экономической зоны «Нойдорф», вторым участком станет ОЭЗ «Новоорловская», а третьим – промзона «Пушкинская». Первыми предприятиями нового кластера стали российские компании: ООО «Герофарм» (создание комплекса по производству инъекционных лекарственных средств до 55 млн флаконов готовых лекарственных форм. Объем инвестиций – 1.3 млрд руб.); ЗАО «Биокад» (производство оригинальных и воспроизведенных лекарственных препаратов, применяемых в онкологии, неврологии, урологии и гинекологии. Объем инвестиций – 1.07 млрд руб.); ООО «Неон» (производит медицинское и фармацевтическое оборудование, фармпродукцию. Объем инвестиций – 910 млн руб.); ООО «Самсон-Мед» (производство лекарственных средств на основе природных биологически активных веществ. Объем инвестиций – 1.5 млрд руб.).

27 октября 2010 года Законодательное собрание Санкт-Петербурга приняло в целом проект закона Санкт-Петербурга «О внесении изменений в Закон Санкт-Петербурга «О налоговых льготах»». Ставки налога на прибыль для организаций-инвесторов снизят до 13.5%, а также инвесторов освободят от уплаты налога на имущество. Ранее ставка налога на прибыль колебалась в зависимости от объема инвестиций

и доходила до 15.5%. Кроме того, законом устанавливаются единые «пороговые» значения объемов вложений для получения налоговых льгот от 800 млн рублей и более. При этом ранее ставкой 13.5% могли пользоваться только организации с объемом инвестиций от 3 млрд рублей. Также поправками к закону увеличивается период пользования льготой – с 3 до 5 лет. Если раньше вложения инвестор должен был делать в течение одного года, то теперь в течение трех лет. Устанавливаются и некоторые особенности условий и требований для организаций-инвесторов, осуществляющих производство высокотехнологичной продукции. Так, льготы по налогу на прибыль они смогут получить при сумме вложений, начиная от 50 млн рублей и более.

Это лишь несколько примеров реализации Концепции создания фармацевтических кластеров. Насколько такие фармкластеры оправдают надежды всех участников со стороны бизнеса, государства, региональных властей и как вообще оценить эффектив-

ность кластера? По количеству привлеченных участников (предприятия и созданные НИЦ), по количеству зарегистрированных и выведенных на рынок лекарственных средств, объему привлеченных инвестиций или годовому объему производства лекарственных препаратов?

Региональные власти прилагают огромные усилия по созданию благоприятной инвестиционной среды и организации не только производства, но и инновационного процесса на территории создаваемых фармацевтических кластеров. Тенденция создания кластеров подкрепляется поддержкой со стороны государства, которое видит в кластерах не только инструмент инновационного развития экономики, но и решение некоторых социальных аспектов, таких, как занятость населения и образование. Несомненно, такая тенденция к созданию фармацевтических кластеров требует регулирования правовых аспектов. Для защиты интересов резидентов фармкластеров все чаще среди компаний-участников звучат призывы создать Ассоциацию

российских фармацевтических кластеров. В октябре Комитет Торгово-промышленной палаты по предпринимательству в здравоохранении и медпромышленности провел совещание, на котором вынес предложение разработать отдельную Концепцию развития фармкластеров в РФ. Эта инициатива влечет за собой формирование рабочей группы с участием представителей Минэкономразвития России, Минпромторга России, Минздравсоцразвития России, Роспатента, других ведомств, региональных органов власти, научной общественности, объединений предпринимателей и делового сообщества. Участники заседания также предложили руководству ТПП РФ обратиться в Правительство Российской Федерации с инициативой предусмотреть в проекте Федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации до 2020 года» в качестве отдельного раздела «Развитие фармацевтических кластеров в Российской Федерации».

Виктор Дмитриев, генеральный директор Ассоциации российских фармпроизводителей

Многие заявили о строительстве кластеров. Однако определения понятия кластера у нас на законодательном уровне не существует. Что касается вопроса создания Ассоциации российских фармацевтических кластеров, то АРФП не против создания Ассоциации фармкластеров, однако, хотелось бы понять, с какой целью? Ассоциации создаются для решения определенных вопросов, лоббирования интересов.



Более того, некоторые не понимают, с какой целью на террито-

рии региона строится кластер. Чтобы создать рабочие места, развивать фармпромышленность и обеспечить жителей доступными по цене лекарственными средствами? Или чтобы развивать науку и разработать инновационные лекарственные препараты? Или чтобы потешить свои политические амбиции? Цели создания фармкластеров должны быть увязаны с госзаказом. То есть результат их работы должен влиять на снижение смертности и заболеваемости и на рост уровня жизни – это основные индикаторы здравоохранения.

Лично я могу отметить пар тройку перспективных в этом плане проектов, где действительно четко прописаны цели, есть науч-

ный потенциал, производственная база, высококвалифицированные кадры, развитая инфраструктура, инвесторы и т.д. В таком случае фармацевтический кластер будет действительно выполнять свои функции. Например, в Петербурге есть все для того, чтобы сложился кластер. Есть наука, образование, непосредственно само производство, есть желающие и инвесторы, которые готовы строить фармпроизводство. То, что в Питере хорошо развита наука, дает надежду, что развитие кластера пойдет по инновационному пути, не повторяя, что уже существует. Все подготовлено под новые препараты. Есть еще хороший пример – Ярославль, Калуга.

УДК 575:599.9

Геномы, популяции, болезни: этническая геномика и персонафицированная медицина

В. А. Степанов

НИИ медицинской генетики СО РАМН, 634050, Томск, Набережная Ушайки, 10

E-mail: vadim.stepanov@medgenetics.ru

Поступила в редакцию 19.09.2010 г.

РЕФЕРАТ Обсуждается сопряженное развитие этнической генетики, генетики распространенных болезней и концепций персонафицированной медицины. Показано, каким образом структура генетического разнообразия популяций человека взаимосвязана с различиями по частотам менделирующих и мультифакторных заболеваний. Рассмотрены популяционные основы фармакогенетики и оценки эффективности фармакотерапии, достижения и перспективы индивидуальной геномики.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА Геномная медицина, персонафицированная медицина, этническая генетика, популяционная генетика человека, генетическое разнообразие, мультифакторные болезни, полногеномный анализ ассоциаций, фармакогенетика, геном человека, геномика, секвенирование, однонуклеотидные полиморфизмы, персональные геномы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АДЗ – болезни с аутосомно-доминантным наследованием; АРЗ – болезни с аутосомно-рецессивным наследованием; БА – болезнь Альцгеймера; ИБС – ишемическая болезнь сердца; НБ – наследственные болезни; ГВС1 – гипервариабельный сегмент I; мтДНК – митохондриальная ДНК; МФЗ – мультифакторные заболевания; ПДРФ – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов; ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких; SNP (single nucleotide polymorphism) – однонуклеотидный полиморфизм; CNV (copy number variation) – вариабельность по числу копий; STR (short tandem repeats) – короткие тандемные повторы; NapMap (Haplotype Map) – проект построения карты гаплотипов гаплоидного генома человека; CEU (Central Europeans) – популяция центрально-европейского происхождения; YRI (Yoruba, Ibadan) – популяция йоруба (Ибадан, Нигерия); CHB (Chinese, Beijing) – популяция китайцев (Пекин); JPT (Japanese, Tokyo) – популяция японцев (Токио); СМТ1 (Charcot-Marie-Tooth type 1) – болезнь Шарко-Мари-Тута тип 1; GWAS (genome-wide associations search) – полногеномный поиск ассоциаций; OR (odds ratio) – отношение шансов; ОММ (on-line Mendelian inheritance in man) – он-лайн-каталог менделевского наследования у человека.

ВВЕДЕНИЕ

Персонафицированная медицина

Идея персонафицированной медицины, ставящая в центр внимания конкретного больного со всеми его особенностями, не нова. На нее опирались еще классики российской медицины XIX века – М.Я. Мудров и Н.И. Пирогов. «Врач лечит не болезнь, а больного... Каждый больной по различию сложения требует особого лечения, хотя болезнь одна и та же», – писал Мудров. Подчеркивали великие врачи прошлого и профилактический характер индивидуализированной медицины – «Взять в руки людей здоровых... Предписать им надлежащий образ жизни» [1] и «болезнь легче предупредить, чем лечить» [2]. Новое прочтение и реальное наполнение идея персонального подхода к больному получила в век развития молекулярной

генетики, оформившись в конце 90-х годов XX века в концепцию геномной медицины [3, 4], под которой, в самом общем виде, понимают «рутинное использование генотипического анализа, обычно в форме ДНК-тестирования, с целью улучшения качества медицинской помощи» [3]. Современное прочтение персонафицированной медицины основывается на принципах превентивной (упреждающей) медицины, обоснованной лауреатом Нобелевской премии Жаном Доссе [5]. Ее содержание наиболее полно раскрывается в принципе медицины четырех П, или системной медицины, сформулированных Лероем Худом [6–8], согласно которому «реактивная» медицина (реагирующая на болезнь и борющаяся с симптомами) должна превратиться в медицину предиктивную, превентивную, персонафицированную и партисипаторную (медицину участия) – т.е. в медицину, направленную

на предсказание болезни до ее симптоматического проявления; предупреждающую болезнь; учитывающую индивидуальные (прежде всего, генетические) особенности пациента; подразумевающую активное участие пациента в выявлении его генетических особенностей и превентивных мерах.

В России идея персонифицированной медицины, базирующейся на достижениях молекулярной генетики, активно развивается в исследованиях нескольких генетических школ, развивающих концепции «геномной медицины» (научная школа академика РАМН В.П. Пузырева [9–11]) и «генетического паспорта» (научная школа члена-корреспондента РАМН В.С. Баранова [12–14]).

Этническая генетика

Генетические особенности индивида в значительной мере определяются его принадлежностью к определенному географическому региону, этнической группе, популяции. Оставляя за скобками настоящей работы дискуссию о сущности, терминологических и смысловых различиях географического, этнического и популяционного уровня организации генофонда, в контексте персонифицированной медицины будем рассматривать эти термины как синонимичные по сути – отражающие индивидуальные особенности человека вследствие его генетического происхождения.

Общепризнано, что детальное понимание генетической вариабельности в популяциях человека служит ключом к выявлению генетических основ распространенных заболеваний [15]. Подходы, направленные на выявление генетических взаимоотношений между различными этническими группами и популяциями на основе исследования полиморфных генетических маркеров, применяются в популяционной и эволюционной генетике человека с середины 1950-х годов. Первоначально в качестве генетических маркеров использовали белковый полиморфизм [16–18]. С развитием молекулярной генетики популяционные исследования были переориентированы на различные классы ДНК-маркеров, в первую очередь, – нерекомбинантные линии мтДНК и Y-хромосомы [19–21 и др.]. Эти работы позволили сформировать представления об основных этапах расселения и этнической дивергенции современного человека и вылились в формирование отдельного научного направления – этногенетики. Этногенетика, по определению Балановской и Рычкова [22], есть раздел популяционной генетики, в котором «особое внимание уделяется этнической структуре популяций, а целью является выяснение генетических последствий этноисторического и экологического развития народонаселения».

В самое последнее время в качестве средства описания генетического разнообразия в этносах и популяциях используются полногеномные наборы однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), дополняемые иногда вариабельностью по числу копий (CNV) [23–26 и др.]. В ближайшей перспективе – ресеквенирование полных геномов в представительных выборках из различных популяций.

В России работы по этнической генетике – одно из самых продуктивных генетических направлений, которое активно развивается в ряде научных центров [27–31].

Значение популяционной генетики для персонифицированной медицины определяет и тот факт, что знания о роли генетического разнообразия в патогенезе распространенных заболеваний возможно накопить только путем детального анализа ассоциаций генетических маркеров с болезнью на обширных выборках больных и здорового контроля из различных популяций. В частности, наиболее продуктивный подход к анализу ассоциаций – полногеномный поиск ассоциаций (GWAS) – требует выборок в сотни или тысячи индивидов и обязательной репликации ассоциаций на других популяциях.

Сопряженное развитие этнической генетики, генетики распространенных болезней и концепций персонифицированной медицины рождает несколько ключевых вопросов, ответы на которые будут определять содержание и темпы генетизации предиктивной медицины:

- Насколько существенны межэтнические различия в частотах болезней и частотах генов подверженности к болезням?
- Каковы эволюционные механизмы формирования различий в частотах генов болезней?
- Влияет ли расовое, этническое или географическое происхождение на вклад отдельных генетических вариантов в заболевание?
- В какой мере генетическая вариабельность отвечает за различия в распространенности и исходах болезней между расовыми и этническими группами?
- Есть ли необходимость в информации о расовой/этнической принадлежности для медицинских исследований?

Дать представление о современном состоянии дел в попытках ответить на эти вопросы – задача настоящей статьи.

СТРУКТУРА ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ В ПОПУЛЯЦИЯХ ЧЕЛОВЕКА

Насколько популяции человека отличаются друг от друга генетически? Популяционная генетика человека дает на этот вопрос однозначный ответ – на долю межпопуляционных различий в глобальном

Таблица 1. Генетическая дифференциация популяций человека

Тип маркера	Популяции	F_{ST}	Ссылка
Классические маркеры			
Группы крови	Мировые	0.16	[40]
Белковый полиморфизм	Мировые	0.11	[40]
ДНК-маркеры			
ПДРФ	“-“	0.11	[21]
Динуклеотидные STR	“-“	0.11	[41]
Тринуклеотидные STR	“-“	0.04	[42]
Тетрануклеотидные STR	“-“	0.04	[21, 43]
Микросателлиты и ПДРФ	“-“	0.15	[44]
Alu-повторы	“-“	0.12	[45]
Alu-повторы	“-“	0.10	[46]
ГВС1 мтДНК	“-“	0.14	[47]
Y-хромосома, гаплогруппы	Сев. Евразия	0.19	[28]
Y-хромосома, STR	Сев. Евразия	0.19	[28]
Широкогеномные наборы маркеров			
600K SNP	YRI, CEU, JPT, CHB	0.12	[48]
1 млн SNP	YRI, CEU, JPT, CHB	0.10	[48]
1 млн SNP	YRI, CEU, JPT, CHB	0.13	[49]
440K SNP	Мировые	0.05	[26]
50K SNP	Азия	0.06	[25]
2.8 млн SNP	YRI, CEU, JPT, CHB	0.11	[50]
244K SNP	Мировые	0.12	[51]
200K SNP	Мировые	0.13	[33]
67 CNV	Мировые	0.11	[52]

масштабе (если сравнивать популяции разных континентов) приходится 10–15% генетического разнообразия человека (табл. 1). Иными словами, значение индекса фиксации Райта (коэффициент F_{st}) при оценке глобального уровня генетической дифференциации популяций человека составляет 0.10–0.15. В этот интервал попадают значения, полученные для большинства систем генетических маркеров классической и молекулярной популяционной генетики человека – группы крови, белковый полиморфизм, ПДРФ, Alu-повторы, гипервариабельные сегменты мтДНК [28, 32]. Исключения – высокомутабильные микросателлиты (STR), по которым уровень генетической дифференциации значительно ниже (4–5%), и Y-хромосома, варианты которой гораздо сильнее различаются в популяциях (20–30%), чем другие системы маркеров. В основе резких отличий этих двух типов маркеров лежат определенные эволюционные, популяционные и социальные механизмы, рассмо-

трение которых оставим за пределами настоящей работы (см., например, [28]).

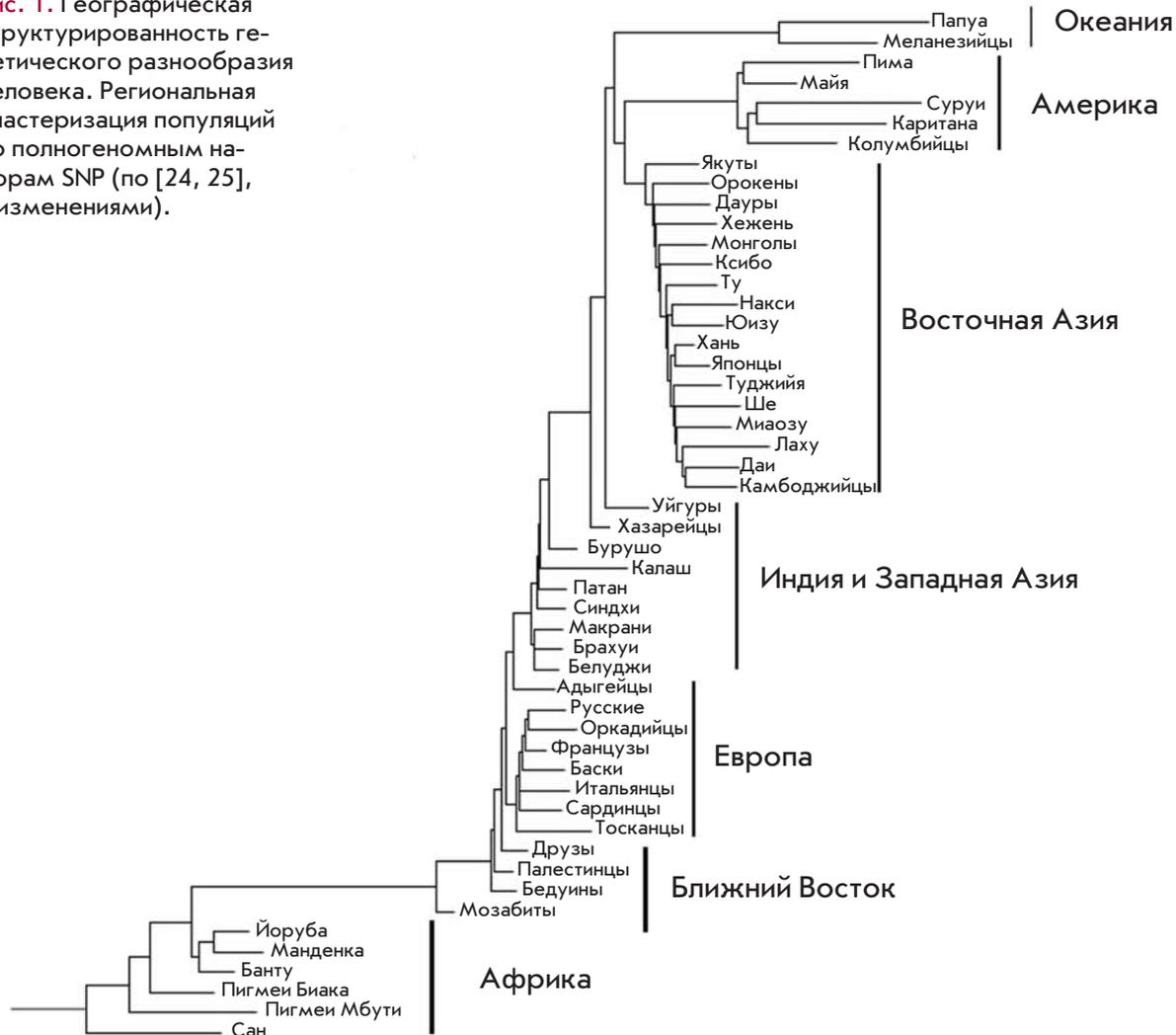
Относительно невысокий уровень генетической подразделенности популяций человека проявляется и на наиболее репрезентативных и всеобъемлющих наборах маркеров – больших случайных выборках аутосомных полиморфизмов, включая полногеномные наборы из сотен тысяч SNP. Так, Ли и соавт. [24] при анализе 650 000 SNP в 51 популяции из панели проекта по разнообразию генома человека (HGDP, Human Genome Diversity Project) показали, что на долю межпопуляционных различий приходится 11% мирового генетического разнообразия. В нашей недавней работе мы получили оценку генетической дифференциации 36 популяций (32 популяции Евразии и 4 популяции HarMap) по 200 тысячам SNP, равную 13.4% [33]. Несколько меньшие генетические различия найдены при анализе меньшего количества континентальных групп. Уровень генетической дифференциации популяций Азии по данным паназиатского консорциума по SNP составил 5.9% [25], а дифференциация популяций Восточной Азии, Южной Азии, Европы и Мексики – 5.2% [26].

Невысокий уровень генетической дифференциации популяций человека по сравнению с близкими видами (сравните, например, с шимпанзе ($F_{ST} = 0.32$) [34] и гориллой ($F_{ST} = 0.38$) [35]) при значительно большем ареале свидетельствует об относительно недавнем происхождении современных людей от небольшого числа основателей.

Наиболее общей закономерностью распределения генетического разнообразия популяций человека является его строгая географическая структурированность, проявляющаяся как кластеризация географически близких популяций. В глобальном масштабе популяции по любым системам маркеров объединяются в расово-континентальные группы – африканские негроиды, европеоиды (среди которых выделяются подкластеры населения Ближнего Востока, Европы и Индии), азиатские монголоиды, австронезийцы и американские индейцы [24, 25, 36] (рис. 1). Закономерность проявляется и на меньших масштабах – для континентальных и субконтинентальных групп популяций [23, 37]. Проекция генетических различий между представительными выборками популяций в пространстве главных компонент или факторов в первом приближении всегда тождественна географической карте. Причина такой картины заключается в эволюционной истории генетического разнообразия, формировавшегося в процессе расселения современного человека, в основном, под действием миграций и дрейфа генов.

Население России также не стало исключением из этой закономерности. Российские попу-

Рис. 1. Географическая структурированность генетического разнообразия человека. Региональная кластеризация популяций по полногеномным наборам SNP (по [24, 25], с изменениями).



ляции кластеризуются в несколько крупных этногеографических групп: славяне, популяции Северного Кавказа, финно-угры Севера Европейской части и Волго-Уральского региона, популяции Южной Сибири и Средней Азии, народы Восточной Сибири и Северной Азии [28, 33]. Географическая структурированность генофонда народов России прослеживается по всем системам генетических маркеров – линиям мтДНК, Y-хромосомы, X-хромосомы, аутосомным маркерам, включая полногеномные наборы SNP.

Пожалуй, единственное крупное отклонение от «географического паттерна» – индийский субконтинент, генетическое разнообразие которого лучше коррелирует с языковой принадлежностью, чем с географией в силу сложной этнической и социальной структуры населения, кастовой иерархии крупных этносов и наличия множества мелких родоплеменных групп [38, 39].

Насколько популяции человека различаются по частотам болезней и частотам генов болезней?

Если полагать вопрос об общих межпопуляционных генетических различиях человека закрытым, то закономерно возникают следующие вопросы: насколько генетическая вариабельность связана с фенотипической вариабельностью, в особенности, для клинических фенотипов (болезней)? Насколько различия в частотах генов болезней определяют межэтнические или межпопуляционные различия в частотах самих болезней? Ответ на первый вопрос можно попытаться найти в данных генетической эпидемиологии и медицинской статистики, второй же требует специальных подходов.

Этническая компонента при моногенных болезнях

Генетическая эпидемиология накопила достаточно большой массив данных по частотам менделирующих (моногенных) болезней в различных популяциях.

Суммарная отягощенность наследственными болезнями (НБ) (сумма частот аутосомно-доминантных, аутосомно-рецессивных и X-сцепленных болезней) в устойчивых сформировавшихся популяциях относительно низка и варьирует в небольших пределах – от 1.5 до 3.5 на 1000 (рис. 2). Например, в 10 российских популяциях, представляющих славянское население, финно-угров и народы Северного Кавказа, суммарная отягощенность НБ колеблется от 1.59 на 1000 в городах Кировской области до 3.5 на 1000 в сельских популяциях марийцев [53]. Те же пределы variability характерны и для НБ у коренных народов Сибири [54, 55]. При этом частота отдельных форм НБ может варьировать гораздо сильнее. Так, частота муковисцидоза в регионах Сибири отличается более чем в 10 раз [56].

В случае НБ различия в частотах заболеваний прямо обусловлены разницей в частотах аллелей в популяциях. Главными факторами популяционной динамики, формирующими картину популяционных различий в отягощенности НБ, являются дрейф генов и эффекты родоначальника [53]. Дрейф при этом играет ведущую роль даже при стабильной численности популяции, а еще больше усиливают его роль резкие изменения эффективной численности (популяционные волны). Роль естественного отбора в дифференциации популяций по генам НБ в целом невелика, поскольку мутации, приводящие к НБ, снижают приспособленность больных независимо от их этнического или географического происхождения.

Однако из этого правила есть весьма примечательные исключения. Самое известное из них – высокая частота гетерозигот по серповидно-клеточной анемии и β-талассемии в субтропических и тропических регионах, в частности в Средиземноморье. Районы высокой частоты указанных эритроцитарных болезней и малярии практически перекрываются [57]. Гетерозиготные носители мутантных аллелей этих генов имеют селективное преимущество, связанное с лучшей устойчивостью к малярии, и высокая частота гетерозигот поддерживается балансирующим отбором.

Еще одна частая наследственная болезнь – муковисцидоз – с высокой частотой встречается у европейцев и гораздо реже в других географических регионах. Широкое распространение основной мутации (ΔF508) по всей Европе и ее редкость в других частях Света означают, что эта мутация возникла достаточно давно, где-то после расселения современного человека из Африки. Прямые оценки возраста этой мутации разными способами свидетельствуют, однако, об относительно недавнем – около 10 тысяч лет назад – ее происхождении [58, 59]. Вероятной причиной широкого распространения мутации в Европе, как и эритроцитарных болезней, представляется селективное преимущество гетерозигот по ΔF508, связанное с меньшей предрасположенностью к обезвоживанию при холере и тифе, которые свирепствовали в Европе относительно недавно.

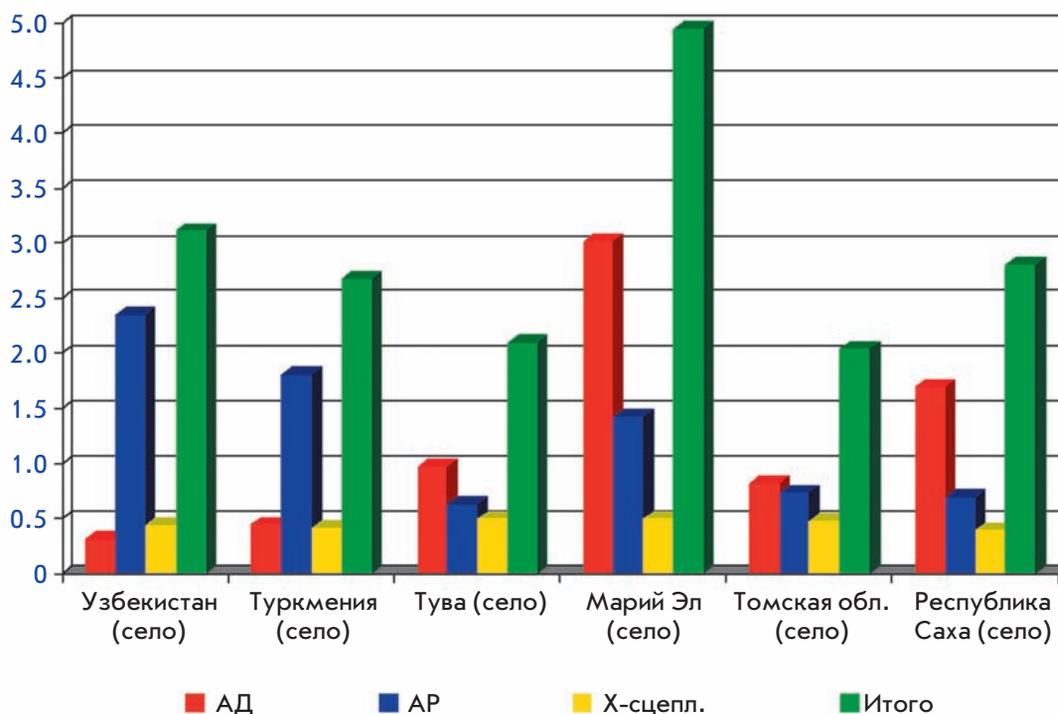


Рис. 2. Суммарная частота моногенных болезней (в промилле) в некоторых популяциях России и сопредельных стран.

Локальная адаптация популяций к пищевым продуктам также может способствовать дифференциации по некоторым болезням. Так, высокая частота целиакии в Северной Европе, особенно в Скандинавии, и низкая – в Южной Европе, вероятно, имеет одной из причин более длительную историю сельского хозяйства, в частности культивирования злаков на юге Европы, в то время как основным источником пищи для древних скандинавов долгое время была охота, и в их рационе практически отсутствовали зерновые.

Роль дрейфа генов и эффекта основателя в распространности НБ хорошо иллюстрирует накопление некоторых форм наследственной патологии в отдельных популяциях. Хорошо известные примеры таких популяций – финны, евреи ашкенази, франко-канадцы, амиши. Описано более 20 так называемых «финских» болезней – НБ (в основном аутосомно-рецессивных), частота которых у финнов значительно выше, чем в любых других популяциях [60, 61]. Феномен накопления НБ у финнов связывают с эффективным дрейфом, долговременной генетической изоляцией и высоким коэффициентом инбридинга. По тем же популяционным механизмам, вероятно, происходило и накопление некоторых НБ у евреев ашкенази. У них также описано как минимум два десятка болезней с очень высокой частотой (самые частые из них – болезнь Тея-Сакса и болезнь Гоше типа 1) [62].

В российских популяциях феномен этноспецифических болезней наиболее ярко проявляется у якутов (табл. 2). К числу «якутских» болезней можно отнести как минимум шесть заболеваний, частота которых у якутов в десятки раз превышает мировую, включая два недавно описанных синдрома низкорослости [63, 64]. Популяционным механизмом

накопления НБ у якутов является эффект основателя, у некоторых болезней совпадающий по времени с волнами экспансии численности и расселения якутов.

В целом, для некоторых менделирующих НБ характерны существенные межэтнические различия в частотах, прямо обусловленные различиями в частотах и спектре мутаций. Эти особенности, несомненно, должны быть учтены (и уже учитываются) при медико-генетическом консультировании, ДНК-диагностике и в скринирующих программах. В этом контексте ДНК-диагностику НБ можно считать одним из первых реальных приложений персонализированной геномной медицины.

Генетическое разнообразие и комплексные болезни. GWAS

Межпопуляционные сравнения частот широко распространенных мультифакторных заболеваний (МФЗ), или комплексных болезней, затруднены отсутствием однообразной медицинской статистики для глобальных популяций, значительной клинической и генетической гетерогенностью МФЗ. Хотя имеется множество наблюдений о различиях в частотах встречаемости МФЗ в разных популяциях – в качестве примера можно привести сердечно-сосудистые заболевания [68, 69], диабет [70], некоторые формы рака [71], глаукому [72], нефропатии [73].

Хорошей моделью для сравнения распространенности комплексных болезней может служить население США – мультирасовой страны с высоко развитым здравоохранением и подробной медицинской статистикой. В табл. 3 приведены показатели смертности по данным Национального центра статистики в здравоохранении в четырех основных расово-этнических группах населения США – у бе-

Таблица 2. Этноспецифические болезни у якутов

Болезнь, номер по OMIM	Частота в мире (на 100 000)	Частота среди якутов (на 100 000)	Ссылка
Спинально-мозжечковая атаксия 1 типа (164400)	1.0	38.6	[65]
Миотническая дистрофия (160900)	4.0–5.0	21.3	[66]
Наследственная энзимопеническая метгемоглобинемия (250800)	1.0	5.7	[67]
Окулофарингеальная мышечная дистрофия (164300)	1.0	11.1	[63, 64]
3-M синдром (якутский синдром низкорослости) (273750)	25 случаев	12.72	[64]
Синдром низкорослости с колбочковой дисфункцией, атрофией зрительных нервов и пельгеровской аномалией лейкоцитов (SCOP) (в OMIM нет)	Не описан	9.95	[64]

лых американцев, американских негров, испаноязычных выходцев из Латинской Америки и американцев азиатского происхождения [74]. Поскольку общий уровень смертности в пересчете на 100000 сильно различается (у афроамериканцев он в 2 раза выше, чем у латиноамериканцев и азиатов, а смертность белого населения имеет промежуточное значение), мы преобразовали эти данные как долю каждой причины смертности в процентах от общего уровня в каждой этнической группе. В правой части таблицы данные по смертности еще раз преобразованы в виде отношения смертности от определенной причины в трех минорных этнических группах по отношению к белым американцам. Эти данные позволяют заключить, что две основные причины смертности населения США – сердечно-сосудистые и онкологические болезни, в совокупности ответственные за половину общего уровня смертности, не имеют существенных межэтнических различий. По другим же группам болезней различия иногда весьма значительны. Так, относительная смертность от сахарного диабета среди афроамериканцев в полтора раза выше, чем среди белых, а доля смертности от ИБС, хронических болезней легких и почек у черных американцев гораздо ниже. Относительная смертность от сахарного диабета и болезней почек среди испаноязычных американцев более чем в 2 раза выше, чем у белого населения США, а доля хронических болезней легких – в 2 раза ниже. Азиа-

ты значительно чаще по сравнению с белыми американцами умирают от инсульта и пневмонии, но гораздо реже от ХОБЛ и болезней почек.

В какой степени подобные различия могут быть связаны с межэтнической генетической дифференциацией? Важную информацию об этом можно получить с помощью анализа ассоциаций генетических маркеров с комплексными болезнями, включая полногеномный поиск ассоциаций.

Иоаннидис и соавт. [75] сравнили частоты генетических маркеров и их эффект в отношении болезни в европейских, азиатских и африканских популяциях. Они провели мета-анализ 135 ассоциаций ген-болезнь, 45 из которых оказались статистически достоверными либо на уровне общего мета-анализа (32 ассоциации), либо, как минимум, для одной расовой группы (11 ассоциаций). Всего материал 45 значимых мета-анализов охватывал 697 индивидуальных ассоциативных исследований с общим объемом выборок около 300 тысяч индивидов. Авторы зафиксировали статистически значимую гетерогенность частот ассоциированных с болезнью маркеров (т.е. значимые межпопуляционные различия) в 58% ассоциаций ген-болезнь. При этом значимые различия в OR (отношение шансов, мера генетического риска болезни) были выявлены только в 14% мета-анализов. Примечательно, что при межрасовых сравнениях не обнаружены значимые противоположно направленные ассоциации.

Таблица 3. Показатели смертности в четырех основных расовых группах населения США¹

Причины смерти	Доля в общей смертности в пределах расовой группы, %				Смертность относительно белого населения США ²		
	белые	афроамериканцы	латиноамериканцы	азиаты	афроамериканцы	латиноамериканцы	азиаты
Болезни сердца (кроме ИБС)	27	26.6	25.3	25.5	0.98	0.94	0.94
ИБС	17.6	13.9	16.4	16.2	0.79	0.93	0.92
Инсульт	5.2	6	5.7	8.6	1.15	1.09	1.65
Хронические болезни легких	4.9	2.6	2.5	2.8	0.53	0.51	0.57
Рак	26.8	23.3	22.8	28.3	0.87	0.85	1.05
Пневмония / грипп	2.8	2.5	2.9	3.9	0.89	1.03	1.39
Болезни почек/цирроз	1.6	1.1	3.5	0.9	0.69	2.18	0.56
Сахарный диабет	2.7	4.2	5.5	3.3	1.55	2.03	1.22
СПИД	0.6	3	1.8	0.3	5	3	0.5
Внешние причины	10.4	9.9	13.4	9.2	0.95	1.29	0.88
Общая абсолютная смертность (на 100 000)	450.4	690.9	332.8	264.6			

¹ По данным Национального центра статистики в здравоохранении США [74].

² Смертность среди белого населения принята за 1.

Эти данные свидетельствуют, что различия в частотах генов подверженности могут быть одной из причин межэтнических различий в распространенности МФЗ. Но в то же время биологический эффект ассоциированных аллелей однонаправлен независимо от расовой/этнической принадлежности, хотя относительный вклад маркера в болезнь или риск ее развития может отличаться, вероятно, в силу генетического (гаплотипического) окружения, взаимодействий ген-ген и ген-среда.

В последнее время основным источником новых данных о генах подверженности к МФЗ стали полногеномные исследования ассоциаций (GWAS). GWAS требуют высокой мощности анализа, которая обеспечивается как обширными выборками индивидов (несколько сотен или тысяч), репрезентативными в отношении популяции, так и огромным набором (сотни тысяч) полиморфизмов, репрезентативным в отношении варибельности генома. Каталог опубликованных GWAS поддерживается Национальным институтом геномных исследований США и включает GWAS, отобранные по очень строгим критериям: должно быть проанализировано не менее 100000 SNP, а уровень значимости ассоциации SNP-признак должен быть менее 0.00001 [76]. На конец марта 2010 г. каталог содержит 527 опубликованных исследований и 2516 SNP, достоверно ассоциированных с комплексными фенотипами.

Большая часть GWAS проведена на европеоидных популяциях, и надежно оценить межэтническую дифференциацию ассоциированных с болезнью участков генома непосредственно из данных GWAS невозможно. Адейемо и Ротими [77] преодолели эту проблему, проанализировав генетическую гетерогенность выбранных из каталога GWAS маркеров на популяциях проекта НарМар. Проект НарМар (карта гаплотипов человека) содержит на сегодня данные о полиморфизме нескольких миллионов SNP и уровне неравновесия по сцеплению по всему геному для 11 популяций различного этнического происхождения, представляющих мировое население (европейцы, азиаты, африканцы, индийцы, латиноамериканцы). Адейемо и Ротими выбрали из каталога GWAS 621 SNP, ассоциированные с 26 комплексными болезнями, включая болезнь Альцгеймера, гипертонию, ожирение, шизофрению, сахарный диабет 1-го и 2-го типов, ревматоидный артрит, некоторые формы рака и др. Аллельные частоты выбранных SNP варьировали в мировых популяциях в довольно широких пределах – вплоть до 20–40-кратной разницы в частоте между парами популяций. Доля межпопуляционного генетического разнообразия (F_{st}) тоже сильно варьировала от маркера к маркеру (например, от 0.02 до 0.2 для диабета 2-го типа или от 0.006 до 0.52 для уровня

липидов). Средний же уровень межпопуляционных отличий составил 10.5%, т.е. не отличался от уровня дифференциации по условно-нейтральным или полногеномным выборкам маркеров.

Приведенные данные говорят о том, что уровень межпопуляционных и межэтнических различий по генам, ассоциированным с МФЗ, не отличается от общего уровня дифференциации генофонда, а риск развития болезни, связанный с генетическим маркером, может существенно варьировать в популяциях в зависимости от частоты ассоциированного маркера на фоне модифицирующих влияний других генов и факторов среды.

Роль ген-генных и ген-средовых взаимодействий, как правило, трудно дифференцировать, но их совокупный вклад в модификацию риска, ассоциированного с конкретным маркером или геном, может быть очень значительным и популяционно-специфичным. В качестве примера можно привести данные о вкладе аллеля $\epsilon 4$ гена *APOE* в болезнь Альцгеймера (БА). Достоверная ассоциация этого маркера с БА зафиксирована во всех расовых группах, хотя частота его сильно различается (9% у японцев, 14% у белых американцев и 19% у афроамериканцев). Гомозиготное носительство аллеля $\epsilon 4$ увеличивает риск БА в 33 раза у японцев, в 15 – у белых американцев и только в 6 – у американских негров. Для гетерозигот это соотношение 5.6–3–1.1 соответственно.

Таким образом, даже если риск развития комплексной болезни однозначно ассоциирован с конкретным генетическим маркером во всех популяциях и его биологический эффект однонаправлен, то сила этого эффекта или степень риска во многом определяется этно- или популяционно-специфическими факторам как генетической, так, вероятно, и негенетической природы. Данные об этническом происхождении, тем самым, могут дать дополнительную важную информацию для персонализированного прогноза.

ЭТНОГЕНЕТИКА И ФАРМАКОГЕНОМИКА

Одно из главных приложений персонализированной медицины – индивидуализация лекарственной терапии. Ответ на лекарственный препарат, оптимальный класс препарата, его доза и режим применения определяются, по крайней мере частично, генетическими детерминантами. Использование генетических маркеров может помочь в выборе клиницистом правильной стратегии лекарственной терапии. Исходя из этих принципов, фармакогенетика стремится выявить гены и их варианты, определяющие адекватность фармакотерапии и уменьшающие риск развития побочных эффектов. Показано, что большинство широко применяемых лекарственных средств эф-

фективны только у 25–60% больных, и только в США отмечено 2 млн случаев побочного действия, включая порядка 100 тысяч смертельных исходов в год [78].

Фармакогеномика накопила большой массив данных об ассоциациях генетических маркеров с эффектом лекарственных препаратов. За последние 20 лет опубликовано около 2000 работ на эту тему, выявлены сотни генов, связанных с фармакотерапией [79]. Большая часть фармакогенетических исследований фокусируется на сердечно-сосудистых, онкологических и неврологических заболеваниях.

Управление по пищевым продуктам и лекарственным препаратам Минздрава США (FDA, Food and Drug Administration) к настоящему моменту одобрило включение информации о генетических маркерах в аннотации около 30 лекарственных препаратов, среди которых варфарин, абакавир, иматиниб, аторвастатин и др. [80]. Среди биомаркеров, указанных в аннотациях, гены цитохромов, рецептора липопротеинов низкой плотности, N-ацетилтрансферазы, рецептора эпидермального фактора роста и др. Эффекты фармакотерапии, зависящие от генотипов по этим маркерам, включают клинический ответ на терапию, риск побочных эффектов, выбор оптимальной дозы, чувствительность

или устойчивость к препарату, полиморфизм мишеней для лекарств.

Большая часть фармакогенетически значимых данных получена на европеоидах – более 80% всех опубликованных работ сделаны на жителях Европы и США [80], поэтому информации о межэтнических различиях в эффекте лекарств и роли генетических факторов в них относительно немного. В качестве примера можно упомянуть пониженную эффективность эналаприла, ослабленный сосудорасширяющий эффект нитропруссид натрия (антигипертензивного вазодилатора), сниженную эффективность пропранолола и атенолола (блокаторы адренорецепторов) при терапии гипертонии у афроамериканцев по сравнению с европеоидами [81]. В некоторых случаях межэтнические различия в эффективности лекарств удается связать с различиями в частоте конкретного маркера. Так, различия в эффективности пропранолола и атенолола связаны с более высокой частотой одной из миссенс-мутаций β 1-адренэргического рецептора у белых американцев (72%) по сравнению с афроамериканцами (57%).

Можно предполагать, что межрасовые и межэтнические различия в эффективности фармакотерапии могут быть столь же распространены, как и межпо-

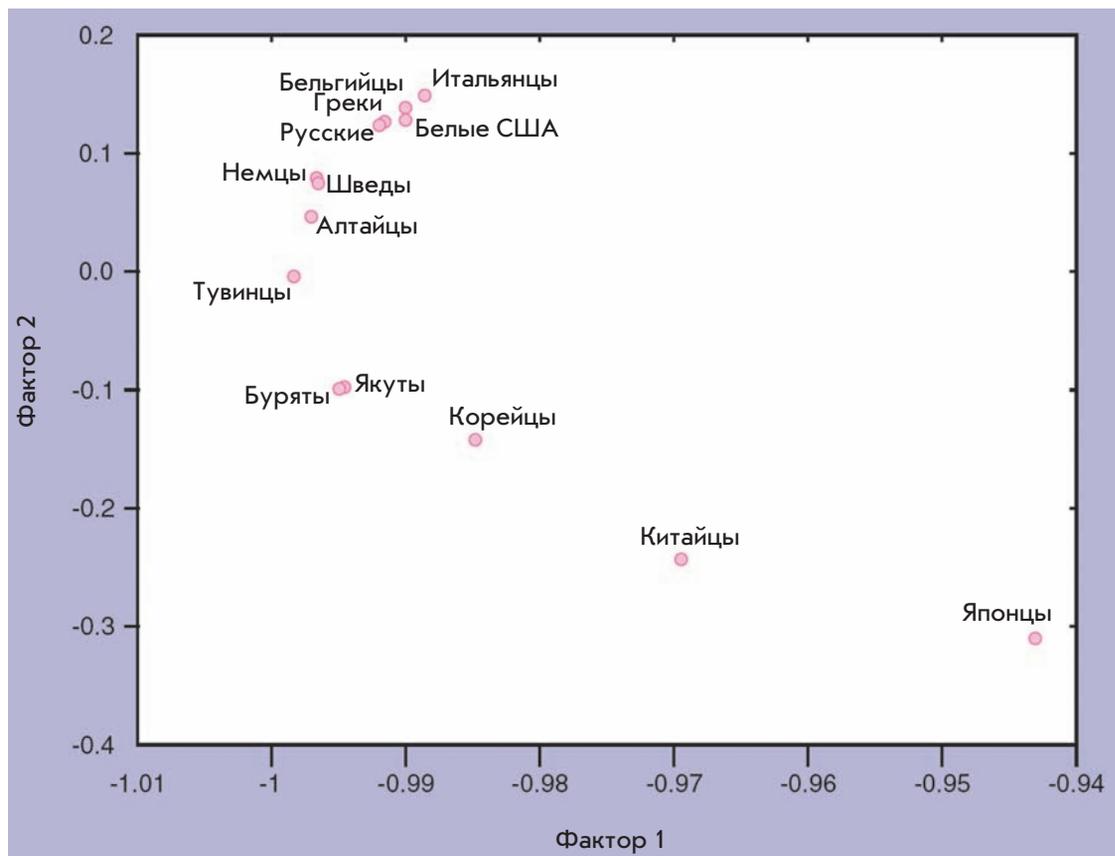


Рис. 3. Географический паттерн российских и мировых популяций в пространстве двух первых главных компонент по частотам аллелей генов CYP (по [83], с изменениями).

пуляционные различия в частотах МФЗ, поскольку генетическая вариабельность генов, метаболизирующих лекарственных препараты, столь же велика, как и у генов подверженности к комплексным заболеваниям [82, 83]. Например, разница в частоте медленных метаболизаторов по цитохрому CYP2D6 между европейцами и азиатами десятикратна (10% у европейцев и 1% у японцев), а этот фермент участвует в метаболизме более 40 препаратов, таких, как часто используемые β -блокаторы и трициклические антидепрессанты. Частота аллелей сверхбыстрых метаболизаторов по этому ферменту варьирует в 10 раз даже в пределах Европы – от 1–2% в Испании до 10% в Швеции. Наши данные также свидетельствуют о значительной вариабельности населения России по генам, участвующим в метаболизме лекарств. Например, частота аллеля CYP2C9*2 одного из генов цитохромов у русских составляет 12% и находится в пределах изменчивости, характерной для европейцев (10–17%), тогда как в популяциях Восточной Азии этот аллель не встречается, а у коренных народов Сибири его частота составляет от 1 до 6% [83]. Общий уровень генетической дифференциации популяций России по генам цитохромов относительно невелик ($F_{st} = 0.021$), однако строго коррелирует с географическим положением, как и большинство других маркерных систем (рис. 3).

ОТ ГЕНОМА ЧЕЛОВЕКА К ГЕНОМУ ИНДИВИДА

Новый пласт данных о генетической вариабельности человека и персонализированном прогнозе здоровья дают работы по ресеквенированию полных индивидуальных геномов. Первым персональным секвенированным геномом был геном Крейга Вентера, одной из ведущих фигур в изучении генома человека. Геном Вентера был получен в октябре 2007 года [84]. Через полгода появилась публикация о втором геноме – нобелевского лауреата Джеймса Уотсона [85]. На текущий момент (середина 2010 года) известна информация о более чем 20 ресеквенированных геномах (табл. 4), включая геномы Крейга Вентера, Джеймса Уотсона, архиепископа Десмонда Туту, дважды просеквенированный геном одного и того же йоруба, геном китайца, двух корейцев, нескольких европейцев, древнего эскимоса, русского, индуса [84–99].

Наряду с полными геномами, принадлежащими неродственным здоровым людям разного происхождения и разной степени известности, секвенированы первые геномы больных моногенными болезнями – четыре генома семейного квартета, в котором дети больны синдромом Миллера (первичной мерцательной дискинезией, его легочной формой, которая фенотипически близка муковисцидозу) [98], а так-

же геном пациента с болезнью Шарко–Мари–Тута первого типа [97]. Опубликованы и как минимум семь полных геномов опухолевых клеток различной локализации – острого миелоидного лейкоза, злокачественной меланомы, глиобластомы и др. [86, 100–105].

Прогресс в технологиях секвенирования, его скорости и стоимости колоссален. Если геном Вентера, просеквенированный на приборах первого поколения, обошелся его компании примерно в 2 млн долларов, то геномы, секвенируемые на платформах второго поколения (Illumina Genome Analyzer и Applied Biosystems Solid System), стоили 200–500 тысяч, а последние работы по ресеквенированию полных геномов довели стоимость анализа всего лишь до полутора тысяч долларов США. Прогноз Френсиса Коллинза [106], прогнозировавшего в 2001 году стоимость полной последовательности генома в 1000 долларов к 2030 году, сбывся на 20 лет раньше!

В ближайшее время завершится проект «1000 геномов», ставящий своей целью получить надежные полные геномы 2000 индивидов из различных популяций основных географических регионов мира – Африки, Европы, Азии и Америки [107]. На первой фазе этого проекта уже секвенировано с низкой кратностью ($\times 2$ – $\times 10$) 180 образцов из четырех популяций НаpMap (CEU, YRI, CHB и JPT).

Что нового в понимании генетической вариабельности человека и в приложении к персонализированной медицине дают персональные геномы? Во-первых, открываются новые генетические варианты – в каждом геноме обнаруживается порядка 2.5–4 млн SNP, несколько сотен тысяч инсерций-делетий и несколько сотен или тысяч CNV (табл. 4). Значительная часть этих вариантов описывается впервые. Данные по ресеквенированию полных геномов подтверждают уровень индивидуальной вариабельности генома, оцененной в проекте «Геном человека» – 3 млн SNP в среднем на геном из 3 млрд нуклеотидов дают уровень различий 1 нуклеотид на 1000 п.н.

Геномы двух разных индивидов пересекаются примерно по половине SNP (табл. 5). Степень родства геномов при этом коррелирует с генетической дифференциацией популяций, к которым принадлежат индивидуальные геномы. Геном йоруба пересекается с другими геномами в меньшей степени (38–45% общих SNP), а наиболее близки геномы китайца и корейца (60–67% перекрывающихся SNP).

«Наложение» вариабельных позиций полных геномов на данные, полученные в крупных популяционных проектах (например, в проекте НаpMap), позволяет оценить генетическое происхождение индивида. Например, при сравнении SNP в геномах Вентера,

Таблица 4. Хронология персональных геномов

№ п/п	Дата публикации (подачи)	Индивид	Журнал	Институт (страна)	Платформа	Кратность покрытия	Число SNP (млн)	Примечание
1	2007, октябрь (9 мая 2007)	Крейг Вентер (м)	PloS Biology, [83]	J Craig Venter Institute (США)	ABI 3730xl	7.5	3.47	\$10 млн
2	2008, апрель (3 декабря 2007)	Джеймс Дью Уотсон (м)	Nature [84]	Baylor College of Medicine / 454 Life Sciences (США)	Roche / 454	7.4	3.32	\$2 млн
3	2008, ноябрь (28 мая 2008)	Евро-американка с острым миелодидным лейкозом (нормальные клетки кожи) (ж)	Nature [85]	University of Washington (США)	Illumina	13.9	2.92	\$1 млн
4	2008, ноябрь (24 июня 2008)	Йоруба (NA18507) (м)	Nature [86]	Illumina / University of Cambridge (Англия)	Illumina	41	3.45	\$250 000
5	2008, ноябрь (21 августа 2008)	Китаец (Yanhuang, YH) (м)	Nature [87]	Beijing Genomic Institute (Китай)	Illumina	36	3.07	\$500 000
6	2009, май (3 февраля 2009)	Кореец Seong-Jin Kim, SJK (м)	Genome Research [89]	Gachon University of Medicine and Science (Корея)	Illumina	29	3.44	
7	2009, июнь (1 февраля 2009)	Йоруба (NA18507) (м)	Genome Research [90]	Life Technologies (США)	ABI SOLiD	17.9	3.87	
8	2009, август (6 марта 2009)	Кореец, АК1 (м)	Nature [91]	Seoul National University (Корея)	Illumina	27.8	3.45	
9	2009, август (10 июня 2009)	Стивен Куэйк, европеоид США, P0 (м)	Nature Biotechnol [92]	Stanford University (США)	Helicos SMS Heliscope	28	2.81	Сиквенс с 1 молекулы \$48 000
10	2009, декабрь	Русский, рак почки (м)	Acta Naturae [93]	РНИЦ Курчатовский институт (Россия)	Illumina / ABI SOLiD	16	?	
11	2010, январь (3 сентября 2009)	Европеоид (NA07022) (м)	Science [94]	Complete Genomics (США)	Complete Genomics DNA nanoarray	87	3.08	\$8 000
12	2010, январь (3 сентября 2009)	Йоруба (NA19240) (ж)	Science [94]	Complete Genomics (США)	Complete Genomics DNA nanoarray	63	4.04	\$3 400
13	2010, январь (3 сентября 2009)	Европеоид (NA20431) (м)	Science [94]	Complete Genomics (US)	Complete Genomics DNA nanoarray	45	2.91	\$1 700
14	2010, февраль (30 ноября 2009)	Палеоэскимос, Saqqaq (м)	Nature [95]	University of Copenhagen / Beijing Genomic Institute (Дания / Китай)	Illumina	20	2.19	Древняя ДНК (4000 лет)
15	2010, февраль (11 августа 2009)	Койсан, KB1 (м)	Nature [96]	Pennsylvania State University (США)	Roche / 454 / Illumina	33.4	4.05	
16	2010, февраль (11 августа 2009)	Банту, АВТ архиепископ Десмонд Туту (м)	Nature [96]	Pennsylvania State University (США)	ABI SOLiD / Illumina	37.2	3.62	
17	2010, март	Европеоид, больной СМТ1 (м)	New Eng. J. Med. [97]	Baylor College of Medicine (США)	ABI SOLiD	29.9	3.42	
18	2010, март (7 января 2010)	Родословная #1, мать (Европеоид, ж)	Science [98]	Institute for System Biology / Complete Genomics (США)	Complete Genomics DNA nanoarray	51	2.87	
19	2010, март (7 января 2010)	Родословная #1, отец (Европеоид, м)	Science [98]	Institute for System Biology / Complete Genomics (США)	Complete Genomics DNA nanoarray	88	3.16	
20	2010, март (7 января 2010)	Родословная #1, дочь (Европеоид, ж, больна синдромом Миллера)	Science [98]	Institute for System Biology / Complete Genomics (США)	Complete Genomics DNA nanoarray	54	3.23	
21	2010, март (7 января 2010)	Родословная #1, сын (Европеоид, м, болен синдромом Миллера)	Science [98]	Institute for System Biology / Complete Genomics (США)	Complete Genomics DNA nanoarray	52	3.23	
22	2010, сентябрь (10 апреля 2010)	Ирландец	Genome Biol. [99]	University College Dublin (Ирландия)	Illumina	11	3.12	

Таблица 5. Характеристики шести персональных геномов

Геном	Этническая принадлежность, страна	Число SNP	Перекрытие по числу общих SNP с другими геномами, %					
			HuRef	Уотсон	NA18507	УН	SJK	Saqqaq
HuRef (Вентер)	Белый американец, США	3075858	100	55.8	52.9	51.6	56.4	34.2
Уотсон	Белый американец, США	3321942	51.6	100	50.8	49.9	54.9	36
NA18507	Йоруба, Нигерия	4189457	38.8	40.3	100	42.1	45.8	27
УН	Китаец, Китай	3074097	51.6	54	57.3	100	67.3	38.2
SJK	Кореец, Южная Корея	3439107	50.5	53	55.8	60.1	100	39
Saqqaq	Палеоэскимос, Гренландия	2193396	47.9	33.9	32.5	53.5	61.1	100

Уотсона и китайца УН с четырьмя популяциями НарМар (рис. 4) на основе распределения маркеров в популяциях CEU, YRI, CHB и JPT была оценена степень метизации основных расово-этнических компонентов в индивидуальных геномах. Так, в геноме Вентера доля европеоидного, негроидного и монголоидного компонента оценивается как 93.3, 5.1 и 1.6% соответственно. В геноме нобелевского лауреата Уотсона доля европеоидного компонента существенно ниже (73.0%) за счет увеличения вклада негроидных маркеров (25.6%).

С точки зрения индивидуального прогноза здоровья и оценки риска МФЗ каждый персональный геном дает исчерпывающую информацию о носительстве аллелей, связанных с клиническими фенотипами. Точность и значимость прогноза генетического здоровья в этом случае определяется уже не техническими возможностями описания генома, а ограниченностью знаний о феноме и его генетических детерминантах.

Данных о полных геномах пока недостаточно, чтобы систематизировать картину межпопуляционных отличий по генам болезней на полногеномном уровне, хотя сам факт существенных межиндивидуальных и межрасовых отличий по числу маркеров, ассоциированных с МФЗ, очевиден. Так, в геноме Вентера найдено около 50 SNP, ассоциированных с подверженностью к алкоголизму. У йоруба их 30, у Уотсона – 25, а у монголоидов (китайца, корейца и палеоэскимоса) – не более 20. Вентер является рекордсменом по числу SNP, связанных с табачной аддикцией (около 40 SNP). У китайца и древнего гренландца таких аллелей около 20, а в геномах Уотсона, йоруба и корейца нет вообще.

Наиболее целостный подход к использованию полногеномной информации для индивидуального прогноза здоровья продемонстрирован в недавней работе Эшли и соавт. [108]. Для оценки риска развития какого-либо заболевания в качестве отправной

точки они предложили использовать так называемый претестовый риск – эпидемиологическую оценку риска болезни, например, в простейшем случае – частоту заболевания в соответствующей этнической и возрастной группе. Затем в индивидуальном геноме выявляются SNP, достоверно ассоциированные с болезнью по данным GWAS, и рассчитывается посттестовый риск, рассматривающий каждый из маркеров как независимый фактор риска. Пример расчета индивидуального риска инфаркта миокарда

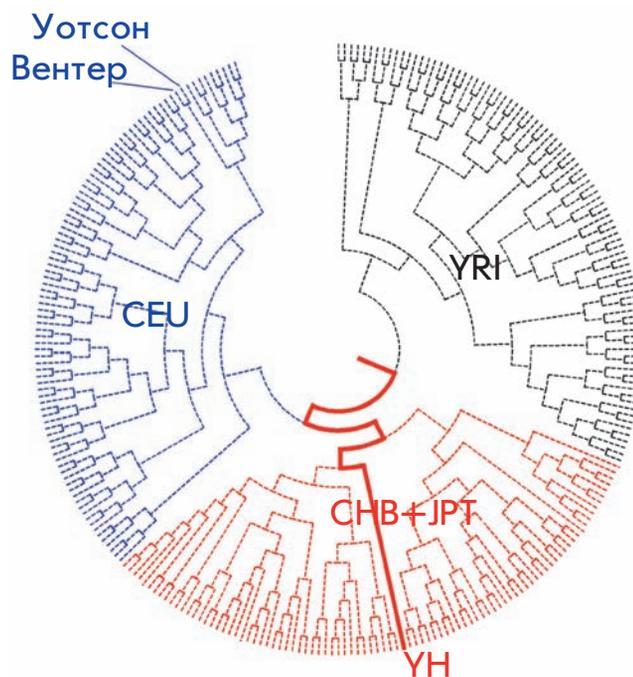


Рис. 4. Индивидуальные геномы Вентера (Venter), Уотсона (Watson) и китайца (УН) на фоне древа индивидов из популяций проекта НарМар (по [88], с изменениями).

Таблица 6. Индивидуальная оценка риска инфаркта миокарда на основе геномных данных (по [108])

Ген	SNP	Генотип	OR	Риск, %
				претестовый 2.0 посттестовый
<i>LPA</i>	rs3798220	CT	1.86	3.7
<i>THBS2</i>	rs8089	AC	1.09	4.0
<i>LDLR</i>	rs14158	GG	2.88	10.6
<i>LIPC</i>	rs11630220	AG	1.15	12.0
<i>ESR2</i>	rs1271572	CC	0.73	9.1
<i>ESR2</i>	rs35410698	GG	1.03	9.4
<i>FXN</i>	rs3793456	AA	0.94	8.9

приведен в табл. 6. Риск был рассчитан для здорового белого американца в возрасте 40 лет, геном которого секвенировали в работе [92]. Донор ДНК имел семейную историю сердечно-сосудистых заболеваний и случаи внезапной смерти среди родственников, нормальные биохимические и электрокардиографические показатели. Претестовый риск по данным эпидемиологии оценивался в 2%. В геноме индивида было найдено семь SNP, для которых GWAS показали достоверную ассоциацию с инфарктом. Значения OR (оценка генетического риска) генотипов, выявленных у тестируемого, варьировали от 0.75 до 2.86. Суммарный же риск инфаркта миокарда (произведение претестового риска и OR каждого из маркеров) составил 8.9%. В данном случае генетическая композиция тестируемого индивида увеличила суммарный риск в 4.5 раза по сравнению с претестовым риском.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для человека характерен относительно небольшой уровень генетических различий (как на уровне дифференциации популяций, так и для индивидуальных геномов) на фоне большой фенотипической вариабельности и строгой географической структурированности генетического разнообразия, проявляющейся как кластеризация географически близких популяций. Пространственный характер распределения генетической вариабельности современного человека проявляется на различных уровнях популяционной организации и на различных группах маркеров, включая гены, ассоциированные с риском развития МФЗ. Генетические различия между популяциями человека в глобальном масштабе ответственны всего за 10–15% генетического разнообразия человека. Однако эти различия оказываются весьма существенными в отношении сферы компетенции персонифицированной медицины – диагностики моногенных болезней, оценки подверженности к распространенным болезням,

прогноза здоровья и эффективности лекарственной терапии.

Возвращаясь к вопросам, сформулированным во «Введении», наше понимание можно кратко суммировать следующим образом. Генетическая дифференциация популяций по генам болезней столь же велика, как и общий уровень межпопуляционного разнообразия на полногеномном уровне. Наблюдаемые межэтнические различия в распространенности болезней человека могут быть либо почти полностью (для менделирующих заболеваний), либо в весьма существенной мере (для МФЗ) объяснены различиями в частотах генов, связанных с болезнью. Общий «географический паттерн» структуры генетического разнообразия сформировался в ходе расселения современного человека под действием миграций, дрейфа генов и резких изменений эффективной численности популяции. В то же время для отдельных участков генома роль естественного отбора в формировании генетического разнообразия как в глобальном масштабе (например, по генам иммунного ответа или пигментации кожи), так и при адаптации популяций к локальным условиям среды (например, по генам метаболизма веществ, поступающих с пищей) может быть очень велика. Биологический эффект отдельных генетических вариантов (мутаций или полиморфизмов) в отношении болезни, как правило, стабилен и не зависит от расового, этнического или географического контекста. При этом сила эффекта (относительный вклад маркера в болезнь или риск ее развития) может значительно варьировать на популяционном и индивидуальном уровне по причине различного генетического (гаплотипического) окружения, модифицирующих взаимодействий ген–ген и ген–среда.

Несомненно, «этнический фактор» должен быть учтен в медицинских исследованиях, особенно в персонифицированной геномной медицине. Долгая история дискуссий по этому вопросу в медицинской и генетической литературе еще не завершена (см., например, [36, 109–111]). Однако профессиональное сообщество исследователей, работающих в области персональной геномики, уделяет популяционным аспектам значительное внимание как на стадии получения информации (например, при GWAS или фармакогеномных исследованиях), так и на стадии интерпретации данных при генетическом тестировании индивидов или генетическом скрининге на популяционном уровне [110].

Интеграция геномики и феномики в рамках системной биологии, появившиеся в последнее время новые мощные инструменты описания и анализа генетического разнообразия – секвенирование индивидуальных геномов и полногеномный анализ SNP

на биочипах, проекты НарМар и «1000 геномов» – дают надежду на быстрый прогресс в каталогизации генетического разнообразия, связанного с риском развития распространенных болезней и эффективностью лекарственной терапии, и на надежную связь фундаментальных научных данных с доказательными рекомендациями для персонифицированной медицины. ●

Работа частично поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (гранты 09-04-00143, 09-04-99028-р_офи) и Федеральной целевой программой «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 годы» (ГК № П321 и 02.740.11.0284).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Мудров М.Я. Избранные произведения / Ред. Гукасян А.Г. М.: Изд-во АМН СССР, 1949. 296 с.
- Сочинения Н.И. Пирогова. Т. 1, 2. Киев: Изд-во Пироговского товарищества, 1910. 682 с.
- Beaudet A. // *Am. J. Hum. Genet.* 1999. V. 64. P. 1–13.
- Bloom B. // *Nature.* 1999. V. 402. № 6761 Suppl. P. C63–64.
- Dausset J. // *Proc. Indiannatn. Sci. Acad.* 1994. V. B60. P. 449–454.
- Hood L., Heath J.R., Phelps M.E., Lin B. // *Science.* 2004. V. 306. P. 640–643.
- Weston A.D., Hood L. // *J. Proteome Res.* 2004. V. 3. P. 179–196.
- Auffray C., Zhu Chen, Hood L. // *Genome Medicine.* 2009. V. 1. P. 2.1–2.11.
- Пузырев В.П., Степанов В.А. Патологическая анатомия генома человека. Томск: STT, 1997. 248 с.
- Пузырев В.П. Волности генома и медицинская патогенетика. Серия «Наследственность и здоровье». Вып. 3. Томск: Печатная мануфактура, 2001. 44 с.
- Пузырев В.П. Геномная медицина – настоящее и будущее. Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике. Вып. 3. Новосибирск: Альфа Виста, 2003. С. 3–26.
- Баранов В.С., Асеев М.В., Баранова Е.В. // *Природа.* 1999. № 3. С. 17–27.
- Баранов В.С. // *Вестн. РАМН.* 2000. № 10. С. 27–37.
- Генетический паспорт – основа индивидуальной и предиктивной медицины / Под ред. Баранова В. С. СПб: Изд-во Н-Л, 2009. 528 с.
- Cavalli-Sforza L.L. // *TIG.* 1998. V. 14. № 2. P. 60–65.
- Mourant A.E. The distribution of the human blood groups. Oxford: Blackwell Scientific, 1954.
- Cavalli-Sforza L.L., Bodmer W.F. The genetics of human populations. San Francisco: W.H. Freeman, 1971.
- Mourant A.E., Kopec A.C., Domaniewska-Sobczak K. The distribution of the human blood groups and other polymorphisms. London: Oxford University Press, 1976.
- Cann R.L., Stoneking M., Wilson A.C. // *Nature.* 1987. V. 325. P. 31–36.
- Underhill P.A., Shen P., Lin A.A., Jin L., Passarino G., Yang W.H., Kauffman E., Bonné-Tamir B., Bertranpetit J., Francalacci P., Ibrahim M., Jenkins T., Kidd J.R., Mehdi S.Q., Seielstad M.T., Wells R.S., Piazza A., Davis R.W., Feldman M.W., Cavalli-Sforza L.L., Oefner P.J. // *Nat. Genet.* 2000. V. 26. P. 358–361.
- Jorde L.B., Bamshad M.J., Watkins W.S., Zenger R., Fraley A.E., Krakowiak P.A., Carpenter K.D., Soodyall H., Jenkins T., Rogers A.R. // *Am. J. Hum. Genet.* 1995. V. 57. P. 523–538.
- Балановская Е.В., Рычков Ю.Г. // *Генетика.* 1990. Т. 26. С. 114–121.
- Novembre J., Johnson T., Bryc K., Kutalik Z., Boyko A.R., Auton A., Indap A., King K.S., Bergmann S., Nelson M.R., Stephens M., Bustamante C.D. // *Nature.* 2008. V. 456. P. 98–101.
- Li J.Z., Absher D.M., Tang H., Southwick A.M., Casto A.M., Ramachandran S., Cann H.M., Barsh G.S., Feldman M., Cavalli-Sforza L.L., Myers R.M. // *Science.* 2008. V. 319. P. 1100–1104.
- HUGO Pan-Asian SNP consortium. // *Science.* 2009. V. 326. P. 1541–1545.
- Auton A., Bryc K., Boyko A.R., Lohmueller K.E., Novembre J., Reynolds A., Indap A., Wright M.H., Degenhardt J.D., Gutenkunst R.N., King K.S., Nelson M.R., Bustamante C.D. // *Genome Res.* 2009. V. 19. P. 795–803.
- Генофонд и геногеография народонаселения. Т. I. Генофонд населения России и сопредельных стран. СПб.: Наука, 2000. 612 с.
- Степанов В.А. Этногеномика населения Северной Евразии. Томск: Печатная мануфактура, 2002. 242 с.
- Лимборская С.А., Хуснутдинова Э.К., Балановская Е.В. Этногеномика и геногеография народов Восточной Европы. М.: Наука, 2002. 264 с.
- Федорова С.А. Генетические портреты народов Республики Саха (Якутия): анализ линий митохондриальной ДНК и Y-хромосомы. Якутск: Изд-во ЯНЦ СО РАН, 2008. 235 с.
- Балановская Е.В., Балановский О.П. Русский генофонд на Русской равнине. М.: Луч, 2007. 416 с.
- Jorde L.B., Wooding S.P. // *Nat. Genet.* 2004. V. 36. P. S28–S33.
- Степанов В.А., Прохорчук Е.Б., Хуснутдинова Э.К., Мазур А.М., Теслюк А., Чеканов Н.Н., Храмева Е., Харьков В.Н., Губина М.А., Кутуев И.А., Хусаинова Р.И., Марусин А.В., Спиридонова М.Г., Ахметова В.Л., Хидиятова И.М., Литвинов С.С., Булыгина Е., Пузырев В.П., Скрябин К.Г. Материалы VI Российского съезда общества медицинских генетиков. Ростов-на-Дону. 14–18 мая 2010 г. // *Медицинская генетика*, 2010. С. 171.
- The Chimpanzee Sequencing and Analysis Consortium // *Nature.* 2005. V. 437. P. 69–87.
- Thalmann O., Fischer A., Lankester F., Paabo S., Vigilant L. // *Mol. Biol. Evol.* 2007. V. 24. P. 146–158.
- Riesch N., Burchardt E., Ziv E., Tang H. // *Genome Biology.* 2002. V. 3. № 7. P. 2007.1–2007.12.
- Tian C., Plenge R.M., Ransom M., Lee A., Villoslada P., Selmi C., Klareskog L., Pulver A.E., Qi L., Gregersen P.K., Seldin M.F. // *PLoS Genetics.* 2008. V. 4. № 1. e4.
- Indian Genome Variation Consortium. // *J. Genet.* 2008. V. 87. № 1. P. 3–20.
- Reich D., Thangaraj K., Patterson N., Price A.L., Singh L. // *Nature.* 2009. V. 461. P. 489–494.
- Nei M., Roychoudhury A.K. Human polymorphic genes: world distribution. N.Y.: Oxford University Press, 1988.

41. Bowcock A.M., Ruiz-Linares A., Tomfohrde J., Minch E., Kidd J.R., Cavalli-Sforza L.L. // *Nature*. 1994. V. 386. P. 455–457.
42. Watkins W.S., Bamshad M., Jorde L.B. // *Hum. Mol. Genet.* 1995. V. 4. P. 1485–1491.
43. Jorde L.B., Rogers A.R., Bamshad M., Watkins W.S., Krakowiak P., Sung S., Kere J., Harpending H.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. V. 94. P. 3100–3103.
44. Barbuhani G., Magagni A., Minch E., Cavalli-Sforza L.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. V. 94. P. 4516–4519.
45. Stoneking M., Fontius J.J., Clifford S.L., Soodyall H., Arcot S.S., Saha N., Jenkins T., Tahir M.A., Deininger P.L., Batzer M.A. // *Genome Res*. 1997. V. 7. P. 1061–1071.
46. Watkins W.S., Rogers A.R., Ostler C.T., Wooding S., Bamshad M.J., Brassington A.M., Carroll M.L., Nguyen S.V., Walker J.A., Prasad B.V., Reddy P.G., Das P.K., Batzer M.A., Jorde L.B. // *Genome Res*. 2003. V. 13. P. 1607–1618.
47. Jorde L.B., Bamshad M., Rogers A.R. // *BioEssays*. 1998. V. 20. P. 126–136.
48. Weir B.S., Cardon L.R., Anderson A.D., Nielsen D.M., Hill W.G. // *Genome Res*. 2005. V. 15. P. 1468–1476.
49. International HapMap Consortium // *Nature*. 2005. V. 437. P. 1299–1320.
50. Barreiro L.B., Laval G., Quach H., Patin E., Quintana-Murci L. // *Nat. Genet.* 2008. V. 40. P. 340–345.
51. Xing J., Watkins W.S., Witherspoon D.J., Zhang Y., Guthery S.L., Thara R., Mowry B.J., Bulayeva K., Weiss R.B., Jorde L.B. // *Genome Res*. 2009. V. 19. P. 815–825.
52. Redon R., Ishikawa S., Fitch K.R., Feuk L., Perry G.H., Andrews T.D., Fiegler H., Shapero M.H., Carson A.R., Chen W., Cho E.K., Dallaire S., Freeman J.L., González J.R., Gratacòs M., Huang J., Kalaitzopoulos D., Komura D., MacDonald J.R., Marshall C.R., Mei R., Montgomery L., Nishimura K., Okamura K., Shen F., Somerville M.J., Tchinda J., Valsesia A., Woodwark C., Yang F., Zhang J., Zerjal T., Zhang J., Armengol L., Conrad D.F., Estivill X., Tyler-Smith C., Carter N.P., Aburatani H., Lee C., Jones K.W., Scherer S.W., Hurles M.E. // *Nature*. 2006. V. 444. P. 444–454.
53. Генетическая структура и наследственные болезни чувашской популяции / Под ред. Гинтера Е.К. Чебоксары: Изд. Дом «Пегас», 2006. 232 с.
54. Пузырев В.П., Назаренко Л.П. Генетико-эпидемиологическое исследование наследственной патологии в Западной Сибири. Томск: STT, 2000. 192 с.
55. Салюкова О.А., Минайчева Л.И., Назаренко Л.П. // *Генетика человека и патология*. 2007. Вып. 8. С. 272–274.
56. Одиноква О.Н., Назаренко Л.П. // *Генетика человека и патология*. 2007. Вып. 8. С. 173–178.
57. Jobling M.A., Hurles M.E., Tyler-Smith C. *Human evolutionary genetics. Origins, peoples and diseases*. N.Y.: Garland Publ., 2004. 524 p.
58. Slatkin M., Bertorelle G. // *Genetics*. 2001. V. 158. P. 449–454.
59. Wiuf C. // *Genet. Res*. 2001. V. 78. P. 41–47.
60. de la Chapelle A. // *Med. Genet.* 1993. V. 30. P. 857–865.
61. Peltonen L., Pekkarinen P., Aaltonen J. // *Biol. Chem. Hoppe-Zeyler*. 1995. V. 376. P. 697–704.
62. Kedar-Barnes I., Rosen P. // *Familial Cancer*. 2004. V. 3. P. 193–199.
63. Максимова Н.Р., Николаева И.А., Коротов М.Н., Икеучи Т., Онодера О., Нишизава М., Степанова С.К., Куртанов Х.А., Сухомясова А.Л., Ноговицына А.Н., Гуринова Е.Е., Степанов В.А., Пузырев В.П. // *Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2008. Т. 108. № 6. С. 52–60.
64. Максимова Н.Р. Клинико-генеалогическая и молекулярно-генетическая характеристика этноспецифических форм наследственной патологии у якутов. Дисс. ... докт. мед. наук. Томск, 2009. 436 с.
65. Платонов Ф.А., Иллариошкин С.Н., Кононова С.К., Гоголев М.П., Иванова-Смоленская И.А. // *Мед. генетика*. 2004. Т. 5. С. 242–248.
66. Сухомясова А.Л. Аутосомно-доминантная миотоническая дистрофия в Республике Саха (Якутия). Автореф. дисс. канд. мед. наук. Томск, 2005. 22 с.
67. Банщикова Е.С. Особенности клинического течения и морфофункциональное состояние эритроцитов у детей с наследственной энзимопенической метгемоглобинемией. Автореф. дисс. канд. мед. наук. Томск, 2002. 25 с.
68. Воевода М.И., Степанов В.А., Ромащенко А.Г., Максимов В.Н. // *Бюлл. СО РАМН*. 2006. № 2. С. 63–72.
69. Wassel C.L., Pankow J.S., Peralta C.A., Choudhry S., Seldin M.F., Arnett D.K. // *Cardiovasc. Genet*. 2009. V. 2. P. 629–636.
70. Karter A.J., Ferrara A., Liu J.Y., Moffet H.H., Ackerson L.M., Selby J.V. // *JAMA*. 2002. V. 287. P. 2519–2527.
71. Shibata A., Whittmore A.S. // *Prostate*. 1997. V. 32. P. 65–72.
72. Tielsch J.M., Sommer A., Katz J., Royall R.M., Quigley H.A., Javitt J. // *JAMA*. 1991. V. 266. P. 369–374.
73. Tarver-Carr M.E., Powe N.R., Eberhardt M.S., LaVeist T.A., Kington R.S., Coresh J., Brancati F.L. // *Jam. Soc. Nephrol*. 2002. V. 13. P. 2363–2370.
74. MacKay A.P., Fingerhut L.A., Duran C.R. *Health, United States. With adolescent health chartbook*. Hayatonsville, Maryland: National Center for Health Statistics, 2000. 456 p.
75. Ioannides J.P., Ntzani E.E., Trikalinos T.A. // *Nat. Genet*. 2004. V. 36. P. 1312–1318.
76. Hindorf L.A., Sethupathy P., Junkins H.A., Ramos E.M., Mehta J.P., Collins F.S., Manolio T.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. P. 9362–9367.
77. Adeyemo A., Rotimi C. // *Public Health Genomics*. 2010. V. 12. P. 72–79.
78. Wilkinson G.R. // *N. Eng. J. Med.* 2005. V. 352. P. 2211–2221.
79. FDA (Food and Drug Administration), 2010. Table of Valid Genomic Biomarkers in the Context of Approved Drug Labels. <http://www.fda.gov/Drugs/ScienceResearch/ResearchAreas/Pharmacogenetics/ucm083378.htm>
80. Holmes M.V., Shah T., Vickery C., Smeeth L., Hingorani A.D., Casas J.P. // *PLoS ONE*. 2009. V. 4. № 12. e7960.
81. Tate S.K., Goldstein D.B. // *Nat. Genet*. 2004. V. 36. P. S21–S27.
82. Wilson J.E., Weale M., Smith A.C. // *Nat. Genet*. 2001. V. 29. P. 265–269.
83. Makeeva O.A., Stepanov V.A., Puzyrev V.P., Grossman A., Goldstein D.B. // *Pharmacogenetics*. 2008. V. 9. P. 847–868.
84. Levy S., Sutton G., Ng P.C., Feuk L., Halpern A.L., Walenz B.P., Axelrod N., Huang J., Kirkness E.F., Denisov G., Lin Y., MacDonald J.R., Pang A.W., Shago M., Stockwell T.B., Tsiamouri A., Bafna V., Bansal V., Kravitz S.A., Busam D.A., Beeson K.Y., McIntosh T.C., Remington K.A., Abril J.F., Gill J., Borman J., Rogers Y.H., Frazier M.E., Scherer S.W., Strausberg R.L., Venter J.C. // *Plos Biol*. 2007. V. 5. № 10. e254.
85. Wheeler D.A., Srinivasan M., Egholm M., Shen Y., Chen L., McGuire A., He W., Chen Y.J., Makhijani V., Roth G.T., Gomes X., Tartaro K., Niazi F., Turcotte C.L., Irzyk G.P., Lupski J.R., Chinault C., Song X.Z., Liu Y., Yuan Y., Nazareth L., Qin X., Muzny D.M., Margulies M., Weinstock G.M., Gibbs R.A., Rothberg J.M. // *Nature*. 2008. V. 452. P. 872–877.
86. Ley T.J., Mardis E.R., Ding L., Fulton B., McLellan M.D., Chen K., Dooling D., Dunford-Shore B.H., McGrath S., Hickenbotham M., Cook L., Abbott R., Larson D.E., Koboldt D.C., Pohl C., Smith S., Hawkins A., Abbott S., Locke D., Hillier L.W., Miner T., Fulton L., Magrini V., Wylie T,

- Glasscock J., Conyers J., Sander N., Shi X., Osborne J.R., Minx P., Gordon D., Chinwalla A., Zhao Y., Ries R.E., Payton J.E., Westervelt P., Tomasson M.H., Watson M., Baty J., Ivanovich J., Heath S., Shannon W.D., Nagarajan R., Walter M.J., Link D.C., Graubert T.A., DiPersio J.F., Wilson R.K. // *Nature*. 2008. V. 456. P. 66–72.
87. Bentley D.R., Balasubramanian S., Swerdlow H.P., Smith G.P., Milton J., Brown C.G., Hall K.P., Evers D.J., Barnes C.L., Bignell H.R., Boutell J.M., Bryant J., Carter R.J., Keira Cheatham R., Cox A.J., Ellis D.J., Flatbush M.R., Gormley N.A., Humphray S.J., Irving L.J., Karbelashvili M.S., Kirk S.M., Li H., Liu X., Maisinger K.S., Murray L.J., Obradovic B., Ost T., Parkinson M.L., Pratt M.R., Rasolonjatovo I.M., Reed M.T., Rigatti R., Rodighiero C., Ross M.T., Sabot A., Sankar S.V., Scally A., Schroth G.P., Smith M.E., Smith V.P., Spiridou A., Torrance P.E., Tzonev S.S., Vermaas E.H., Walter K., Wu X., Zhang L., Alam M.D., Anastasi C., Aniebo I.C., Bailey D.M., Bancarz I.R., Banerjee S., Barbour S.G., Baybayan P.A., Benoit V.A., Benson K.F., Bevis C., Black P.J., Boodhun A., Brennan J.S., Bridgman J.A., Brown R.C., Brown A.A., Buermann D.H., Bundu A.A., Burrows J.C., Carter N.P., Castillo N., Chiara E., Catenazzi M., Chang S., Neil Cooley R., Crake N.R., Dada O.O., Diakoumakos K.D., Dominguez-Fernandez B., Earnshaw D.J., Egbujor U.C., Elmore D.W., Etchin S.S., Ewan M.R., Fedurco M., Fraser L.J., Fuentes Fajardo K.V., Scott Furey W., George D., Gietzen K.J., Goddard C.P., Golda G.S., Granieri P.A., Green D.E., Gustafson D.L., Hansen N.F., Harnish K., Haudenschild C.D., Heyer N.I., Hims M.M., Ho J.T., Horgan A.M., Hoschler K., Hurwitz S., Ivanov D.V., Johnson M.Q., James T., Huw Jones T.A., Kang G.D., Kerelska T.H., Kersey A.D., Khrebtukova I., Kindwall A.P., Kingsbury Z., Kokko-Gonzales P.I., Kumar A., Laurent M.A., Lawley C.T., Lee S.E., Lee X., Liao A.K., Loch J.A., Lok M., Luo S., Mammen R.M., Martin J.W., McCauley P.G., McNitt P., Mehta P., Moon K.W., Mullens J.W., Newington T., Ning Z., Ling Ng B., Novo S.M., O'Neill M.J., Osborne M.A., Osnowski A., Ostadan O., Paraschos L.L., Pickering L., Pike A.C., Pike A.C., Chris Pinkard D., Pliskin D.P., Podhasky J., Quijano V.J., Raczyc C., Rae V.H., Rawlins S.R., Chiva Rodriguez A., Roe P.M., Rogers J., Rogert Bacigalupo M.C., Romanov N., Romieu A., Roth R.K., Rourke N.J., Ruediger S.T., Rusman E., Sanches-Kuiper R.M., Schenker M.R., Seoane J.M., Shaw R.J., Shiver M.K., Short S.W., Sizto N.L., Sluis J.P., Smith M.A., Ernest Sohna Sohna J., Spence E.J., Stevens K., Sutton N., Szajkowski L., Tregidgo C.L., Turcatti G., Vandevondele S., Verhovskiy Y., Virk S.M., Wakelin S., Walcott G.C., Wang J., Worsley G.J., Yan J., Yau L., Zuerlein M., Rogers J., Mullikin J.C., Hurles M.E., McCooke N.J., West J.S., Oaks F.L., Lundberg P.L., Klenerman D., Durbin R., Smith A.J. // *Nature*. 2008. V. 456. P. 53–59.
88. Wang J., Wang W., Li R., Li Y., Tian G., Goodman L., Fan W., Zhang J., Li J., Zhang J., Guo Y., Feng B., Li H., Lu Y., Fang X., Liang H., Du Z., Li D., Zhao Y., Hu Y., Yang Z., Zheng H., Hellmann I., Inouye M., Pool J., Yi X., Zhao J., Duan J., Zhou Y., Qin J., Ma L., Li G., Yang Z., Zhang G., Yang B., Yu C., Liang F., Li W., Li S., Li D., Ni P., Ruan J., Li Q., Zhu H., Liu D., Lu Z., Li N., Guo G., Zhang J., Ye J., Fang L., Hao Q., Chen Q., Liang Y., Su Y., San A., Ping C., Yang S., Chen F., Li L., Zhou K., Zheng H., Ren Y., Yang L., Gao Y., Yang G., Li Z., Feng X., Kristiansen K., Wong G.K., Nielsen R., Durbin R., Bolund L., Zhang X., Li S., Yang H., Wang J. // *Nature*. 2008. V. 456. P. 60–65.
89. Ahn S.M., Kim T.H., Lee S., Kim D., Ghang H., Kim D.S., Kim B.C., Kim S.Y., Kim W.Y., Kim C., Park D., Lee Y.S., Kim S., Reja R., Jho S., Kim C.G., Cha J.Y., Kim K.H., Lee B., Bhak J., Kim S.J. // *Genome Res*. 2009. V. 19. № 9. P. 1622–1629.
90. McKernan K.J., Peckham H.E., Costa G.L., McLaughlin S.F., Fu Y., Tsung E.F., Clouser C.R., Duncan C., Ichikawa J.K., Lee C.C., Zhang Z., Ranade S.S., Dimalanta E.T., Hyland F.C., Sokolsky T.D., Zhang L., Sheridan A., Fu H., Hendrickson C.L., Li B., Kotler L., Stuart J.R., Malek J.A., Manning J.M., Antipova A.A., Perez D.S., Moore M.P., Hayashibara K.C., Lyons M.R., Beaudoin R.E., Coleman B.E., Laptewicz M.W., Sannicandro A.E., Rhodes M.D., Gottimukkala R.K., Yang S., Bafna V., Bashir A., MacBride A., Alkan C., Kidd J.M., Eichler E.E., Reese M.G., De La Vega F.M., Blanchard A.P. // *Genome Res*. 2009. V. 19. P. 1527–1541.
91. Kim J.I., Ju Y.S., Park H., Kim S., Lee S., Yi J.H., Mudge J., Miller N.A., Hong D., Bell C.J., Kim H.S., Chung I.S., Lee W.C., Lee J.S., Seo S.H., Yun J.Y., Woo H.N., Lee H., Suh D., Lee S., Kim H.J., Yavartanoo M., Kwak M., Zheng Y., Lee M.K., Park H., Kim J.Y., Gokcumen O., Mills R.E., Zaranek A.W., Thakuria J., Wu X., Kim R.W., Huntley J.J., Luo S., Schroth G.P., Wu T.D., Kim H., Yang K.S., Park W.Y., Kim H., Church G.M., Lee C., Kingsmore S.F., Seo J.S. // *Nature*. 2009. V. 460. P. 1011–1015.
92. Pushkarev D., Neff N., Quake S.R. // *Nat. Biotechnol*. 2009. V. 27. P. 847–850.
93. Скрыбин К.Г., Прохорчук Е.Б., Мазур А.М., Булыгина Е.С., Цыганкова С.В., Недолужко А.В., Расторгуев С.М., Матвеев В.Б., Чеканов Н.Н., Горанская Д.А., Теслюк А.Б., Груздева Н.М., Велихов В.Е., Заридзе Д.Г., Ковальчук М.В. // *Acta Naturae*. 2009. Т. 1. № 3. С. 113–119.
94. Drmanac R., Sparks A.B., Callow M.J., Halpern A.L., Burns N.L., Kermani B.G., Carnevali P., Nazarenko I., Nilsen G.B., Yeung G., Dahl F., Fernandez A., Staker B., Pant K.P., Baccash J., Borchherding A.P., Brownley A., Cedenro R., Chen L., Chernikoff D., Cheung A., Chirita R., Curson B., Ebert J.C., Hacker C.R., Hartlage R., Hauser B., Huang S., Jiang Y., Karpinchyk V., Koenig M., Kong C., Landers T., Le C., Liu J., McBride C.E., Morenzoni M., Morey R.E., Mutch K., Perazich H., Perry K., Peters B.A., Peterson J., Pethiyagoda C.L., Pothuraju K., Richter C., Rosenbaum A.M., Roy S., Shafto J., Sharanovich U., Shannon K.W., Sheppy C.G., Sun M., Thakuria J.V., Tran A., Vu D., Zaranek A.W., Wu X., Drmanac S., Oliphant A.R., Banyai W.C., Martin B., Ballinger D.G., Church G.M., Reid C.A. // *Science*. 2010. V. 327. P. 78–81.
95. Rasmussen M., Li Y., Lindgreen S., Pedersen J.S., Albrechtsen A., Moltke I., Metspalu M., Metspalu E., Kivisild T., Gupta R., Bertalan M., Nielsen K., Gilbert M.T., Wang Y., Raghavan M., Campos P.F., Kamp H.M., Wilson A.S., Gledhill A., Tridico S., Bunce M., Lorenzen E.D., Binladen J., Guo X., Zhao J., Zhang X., Zhang H., Li Z., Chen M., Orlando L., Kristiansen K., Bak M., Tommerup N., Bendixen C., Pierre T.L., Grønnow B., Meldgaard M., Andreasen C., Fedorova S.A., Osipova L.P., Higham T.F., Ramsey C.B., Hansen T.V., Nielsen F.C., Crawford M.H., Brunak S., Sicheritz-Pontén T., Villems R., Nielsen R., Krogh A., Wang J., Willerslev E. // *Nature*. 2010. V. 463. P. 757–762.
96. Schuster S.C., Miller W., Ratan A., Tomsho L.P., Giardine B., Kasson L.R., Harris R.S., Petersen D.C., Zhao F., Qi J., Alkan C., Kidd J.M., Sun Y., Drautz D.I., Bouffard P., Muzny D.M., Reid J.G., Nazareth L.V., Wang Q., Burhans R., Riemer C., Wittekindt N.E., Moorjani P., Tindall E.A., Danko C.G., Teo W.S., Buboltz A.M., Zhang Z., Ma Q., Oosthuysen A., Steenkamp A.W., Oostuisen H., Venter P., Gajewski J., Zhang Y., Pugh B.F., Makova K.D., Nekrutenko A., Mardis E.R., Patterson N., Pringle T.H., Chiaromonte F., Mullikin J.C., Eichler E.E., Hardison R.C., Gibbs R.A., Harkins T.T., Hayes V.M. // *Nature*. 2010. V. 463. P. 943–947.
97. Lupski J.R., Reid J.G., Gonzaga-Jauregui C., Rio Deiros D., Chen D.C., Nazareth L., Bainbridge M., Dinh H., Jing C.,

- Wheeler D.A., McGuire A.L., Zhang F., Stankiewicz P., Halperin J.J., Yang C., Gehman C., Guo D., Irikat R.K., Tom W., Fantin N.J., Muzny D.M., Gibbs R.A. // *N. Eng. J. Med.* 2010. V. 362. P. 1181–1191.
98. Roach J.C., Glusman G., Smit A.F., Huff C.D., Hubley R., Shannon P.T., Rowen L., Pant K.P., Goodman N., Bamshad M., Shendure J., Drmanac R., Jorde L.B., Hood L., Galas D.J. // *Science*. 2010. V. 328. P. 636–639.
99. Pin Tong, Prendergast J.G.D., Lohan A.J., Farrington S.M., Cronin S., Friel N., Bradley D.G., Hardiman O., Evans A., Wilson J.F., Loftus B. // *Genome Biology*. 2010. V. 11. R91.
100. Mardis E.R., Ding L., Dooling D.J., Larson D.E., McLellan M.D., Chen K., Koboldt D.C., Fulton R.S., Delehaanty K.D., McGrath S.D., Fulton L.A., Locke D.P., Magrini V.J., Abbott R.M., Vickery T.L., Reed J.S., Robinson J.S., Wylie T., Smith S.M., Carmichael L., Eldred J.M., Harris C.C., Walker J., Peck J.B., Du F., Dukes A.F., Sanderson G.E., Brummett A.M., Clark E., McMichael J.F., Meyer R.J., Schindler J.K., Pohl C.S., Wallis J.W., Shi X., Lin L., Schmidt H., Tang Y., Haipek C., Wiechert M.E., Ivy J.V., Kalicki J., Elliott G., Ries R.E., Payton J.E., Westervelt P., Tomasson M.H., Watson M.A., Baty J., Heath S., Shannon W.D., Nagarajan R., Link D.C., Walter M.J., Graubert T.A., DiPersio J.F., Wilson R.K., Ley T.J. // *N. Engl. J. Med.* 2009. V. 361. P. 1058–1066.
101. Pleasance E.D., Cheetham R.K., Stephens P.J., McBride D.J., Humphray S.J., Greenman C.D., Varela I., Lin M.L., Ordóñez G.R., Bignell G.R., Ye K., Alipaz J., Bauer M.J., Beare D., Butler A., Carter R.J., Chen L., Cox A.J., Edkins S., Kokko-Gonzales P.I., Gormley N.A., Grocock R.J., Haudenschild C.D., Hims M.M., James T., Jia M., Kingsbury Z., Leroy C., Marshall J., Menzies A., Mudie L.J., Ning Z., Royce T., Schulz-Trieglaff O.B., Spiridou A., Stebbings L.A., Szajkowski L., Teague J., Williamson D., Chin L., Ross M.T., Campbell P.J., Bentley D.R., Futreal P.A., Stratton M.R. // *Nature*. 2010. V. 463. P. 191–196.
102. Pleasance E.D., Stephens P.J., O'Meara S., McBride D.J., Meynert A., Jones D., Lin M.L., Beare D., Lau K.W., Greenman C., Varela I., Nik-Zainal S., Davies H.R., Ordoñez G.R., Mudie L.J., Latimer C., Edkins S., Stebbings L., Chen L., Jia M., Leroy C., Marshall J., Menzies A., Butler A., Teague J.W., Mangion J., Sun Y.A., McLaughlin S.F., Peckham H.E., Tsung E.F., Costa G.L., Lee C.C., Minna J.D., Gazdar A., Birney E., Rhodes M.D., McKernan K.J., Stratton M.R., Futreal P.A., Campbell P.J. // *Nature*. 2010. V. 463. P. 184–190.
103. Shah S.P., Morin R.D., Khattra J., Prentice L., Pugh T., Burleigh A., Delaney A., Gelmon K., Guliany R., Senz J., Steidl C., Holt R.A., Jones S., Sun M., Leung G., Moore R., Severson T., Taylor G.A., Teschendorff A.E., Tse K., Turashvili G., Varhol R., Warren R.L., Watson P., Zhao Y., Caldas C., Huntsman D., Hirst M., Marra M.A., Aparicio S. // *Nature*. 2009. V. 461. P. 809–813.
104. Ding L., Ellis M.J., Li S., Larson D.E., Chen K., Wallis J.W., Harris C.C., McLellan M.D., Fulton R.S., Fulton L.L., Abbott R.M., Hoog J., Dooling D.J., Koboldt D.C., Schmidt H., Kalicki J., Zhang Q., Chen L., Lin L., Wendl M.C., McMichael J.F., Magrini V.J., Cook L., McGrath S.D., Vickery T.L., Appelbaum E., Deschryver K., Davies S., Guintoli T., Lin L., Crowder R., Tao Y., Snider J.E., Smith S.M., Dukes A.F., Sanderson G.E., Pohl C.S., Delehaanty K.D., Fronick C.C., Pape K.A., Reed J.S., Robinson J.S., Hodges J.S., Schierding W., Dees N.D., Shen D., Locke D.P., Wiechert M.E., Eldred J.M., Peck J.B., Oberkfell B.J., Lolofie J.T., Du F., Hawkins A.E., O'Laughlin M.D., Bernard K.E., Cunningham M., Elliott G., Mason M.D., Thompson D.M., Jr., Ivanovich J.L., Goodfellow P.J., Perou C.M., Weinstock G.M., Aft R., Watson M., Ley T.J., Wilson R.K., Mardis E.R. // *Nature*. 2010. V. 464. P. 999–1005.
105. Clark M.J., Homer N., O'Connor B.D., Chen Z., Eskin A., Lee H., Merriman B., Nelson S.F. // *PLoS Genet.* 2010. V. 6. e1000832.
106. International Human Genome Sequencing Consortium // *Nature*. 2001. V. 409. P. 860–921.
107. 1000 Genomes Meeting Report: A workshop to plan a deep catalog of human genetic variation. <http://www.1000genomes.org/page.php>
108. Ashley E.A., Butte A.J., Wheeler M.T., Chen R., Klein T.E., Dewey F.E., Dudley J.T., Ormond K.E., Pavlovic A., Morgan A.A., Pushkarev D., Neff N.F., Hudgins L., Gong L., Hodges L.M., Berlin D.S., Thorn C.F., Sangkuhl K., Hebert J.M., Woon M., Sagreiya H., Whaley R., Knowles J.W., Chou M.F., Thakuria J.V., Rosenbaum A.M., Zaranek A.W., Church G.M., Greely H.T., Quake S.R., Altman R.B. // *Lancet*. 2010. V. 375. P. 1525–1535.
109. Cooper R.S. // *Int. J. Epidemiol.* 2002. V. 32. P. 23–25.
110. Khoury M.J., McBride C.M., Schully S.D., Ioannidis J.P., Feero W.G., Janssens A.C., Gwinn M., Simons-Morton D.G., Bernhardt J.M., Cargill M., Chanock S.J., Church G.M., Coates R.J., Collins F.S., Croyle R.T., Davis B.R., Downing G.J., Duross A., Friedman S., Gail M.H., Ginsburg G.S., Green R.C., Greene M.H., Greenland P., Gulcher J.R., Hsu A., Hudson K.L., Kardia S.L., Kimmel P.L., Lauer M.S., Miller A.M., Offit K., Ransohoff D.F., Roberts J.S., Rasooly R.S., Stefansson K., Terry S.F., Teutsch S.M., Trepanier A., Wanke K.L., Witte J.S., Xu J., Centers for Disease Control and Prevention // *Genetics in Medicine*. 2009. V. 11. P. 559–567.
111. Genetics of the human race // *Nat. Genet.* 2004. V. 36. № 11. Suppl. Special Issue.

УДК 577.2:616-006

Синдром наследственного рака молочной железы и яичников в Российской Федерации

А. П. Соколенко^{1,2}, А. Г. Иевлева^{1,2}, Н. В. Митюшкина¹, Е. Н. Суспицын^{1,2},
Е. В. Преображенская¹, Е. Ш. Кулигина¹, Д. А. Воскресенский², О. С. Лобейко¹,
Н. Ю. Крылова¹, Т. В. Городнова¹, К. Г. Буслов², Е. М. Бит-Сава¹, Г. Д. Долматов⁴,
Н. В. Порханова⁵, И. С. Поляков⁵, С. Н. Абышева¹, А. С. Катанугина¹, Д. В. Баходдин¹,
Г. А. Янус^{1,2}, А. В. Того¹, В. М. Моисеенко^{1,3}, С. Я. Максимов¹, В. Ф. Семиглазов¹,
Е. Н. Имянитов^{1,2,3*}

¹НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова, 197758, С.-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 68

²Государственная педиатрическая медицинская академия, 194100, С.-Петербург, ул. Литовская, 2

³Медицинская академия последипломного образования, 191015, С.-Петербург, ул. Кирочная, 41

⁴Городской онкологический диспансер, 197022, С.-Петербург, 2-я Березовая аллея, 3/5

⁵Кубанский государственный медицинский университет, 350063, Краснодар, ул. Седина, 4

*E-mail: evgeny@imyanyitov.spb.ru

Поступила в редакцию 20.09.2010 г.

РЕФЕРАТ Синдром наследственного рака молочной железы (РМЖ) и рака яичников (РЯ) вносит существенный вклад в онкологическую заболеваемость: на его долю приходится 5–7% всех случаев РМЖ и более 10–15% РЯ. Мутации в классических генах семейного РМЖ/РЯ – *BRCA1* и *BRCA2* – встречаются примерно в 20–30% родословных. Помимо *BRCA1* и *BRCA2*, определенная роль в формировании к предрасположенности к РМЖ/РЯ принадлежит мутациям в генах *CHEK2*, *NBS1*, *PALB2* и т.д. Эпидемиология генов наследственного рака в Российской Федерации весьма своеобразна. В частности, у жителей России исключительно выражен «эффект основателя»: подавляющее большинство мутаций в генах *BRCA1* представлено единственным вариантом, *BRCA1* 5382insC. К другим повторяющимся мутациям следует отнести *BRCA1* 4153delA и *BRCA1* 185delAG. Помимо *BRCA1*, определенный вклад в заболеваемость РМЖ в России вносят гены *CHEK2* и *NBS1*. В отличие от *BRCA1* и *BRCA2*, гетерозиготный статус *CHEK2* и *NBS1* не сопровождается заметным увеличением риска РЯ. Интересным направлением российских исследований является монотерапия опухолей цисплатином у носительниц мутаций в гене *BRCA1*. Первые результаты, полученные в нескольких клиниках страны, подтверждают уникальную эффективность цисплатина при этой разновидности новообразований.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА рак молочной железы, рак яичника, наследственные опухолевые синдромы, *BRCA1*, *CHEK2*, *NBS*.

ВВЕДЕНИЕ

Рак молочной железы (РМЖ) и рак яичника (РЯ) вносят значительный вклад в онкологическую заболеваемость и смертность. РМЖ самая частая злокачественная патология у женщин: его индивидуальный риск на протяжении жизни составляет примерно 10%. В ряде случаев РМЖ достаточно легко обнаруживается на ранних стадиях и полностью излечивается. К сожалению, даже повсеместное внедрение скрининга лишь незначительно сократило смертность от РМЖ: это связано с недостаточной чувствительностью диагностических подходов, а также с высоким метаста-

тическим потенциалом некоторых форм РМЖ [1]. РЯ встречается значительно реже РМЖ – не более чем у 1.5% жительниц планеты, однако практически всегда это заболевание обнаруживают на поздних неизлечимых стадиях. Опухоли яичника длительное время развиваются бессимптомно, а методы их обнаружения – ультразвуковое исследование и анализ уровня маркера СА-125 – отличаются невысоким уровнем надежности [2]. РМЖ и РЯ представляют собой заболевания одной и той же системы организма – репродуктивной, поэтому они характеризуются определенным сходством гормональных, метаболических и

поведенческих факторов риска. Интересно, что эти два заболевания являются главными компонентами самого частого наследственного синдрома у человека – так называемого синдрома наследственного РМЖ/РЯ (breast-ovarian hereditary cancer syndrome) [3].

Этот синдром стал предметом интенсивного изучения в начале 1990-х гг. В 1994 г. был открыт первый ген, ассоциированный с данным заболеванием, – *BRCA1* (BReast CAncer 1) [4], а годом позже – второй, *BRCA2* [5]. *BRCA1* и *BRCA2* кодируют непохожие друг на друга белки, однако продукты обоих генов играют ключевую роль в поддержании целостности генома, в частности участвуют в процессах репарации ДНК [6]. Примечательно, что мутации в *BRCA1* или *BRCA2* встречаются не более чем в 20–30% случаев семейного РМЖ/РЯ. Огромные усилия ученых направлены на идентификацию других генов наследственного РМЖ и/или РЯ. В ходе этих исследований обнаружены новые значимые мутации, приводящие к инактивации генов *CHEK2*, *NBS1*, *PALB2* и т.д. [7].

Первые данные о причастности генов *BRCA1* и *BRCA2* к возникновению РМЖ и РЯ получены на жительницах Европы и Северной Америки. Оказалось, что спектр мутаций в этих генах очень широк [8]. Это обстоятельство значительно затрудняет диагностику нарушений нуклеотидной последовательности. Действительно, полноценный анализ *BRCA1* и *BRCA2* включает не только полное секвенирование всех кодирующих участков этих достаточно протяженных генов, но и выявление перестроек посредством метода MPLA (multiple ligation-dependent probe amplification). Еще в середине 1990-х гг. обнаружили, что у некоторых небольших изолированных народностей выражен «эффект основателя» («founder effect») – преобладание так называемых повторяющихся мутаций в *BRCA1* и *BRCA2*. Например, у евреев европейского происхождения (евреев ашкенази) практически все повреждения генов *BRCA1* и *BRCA2* сводятся к мутациям *BRCA1* 185delAG, *BRCA1* 5382insC и *BRCA2* 6174delT, у жителей Исландии – к *BRCA2* 999del5 [9, 10]. Особенности спектра мутаций в том или ином географическом регионе в значительной мере отражаются на организации изучения генов наследственного рака. В странах без выраженного «эффекта основателя» анализируют преимущественно те случаи онкологического заболевания, при которых вероятность обнаружения мутаций достаточно высока, а именно женщины с выраженным семейным онкологическим анамнезом и/или больные с первично-множественными опухолями и/или молодые женщины с РМЖ или РЯ. Присутствие «эффекта основателя» значительно упрощает процедуру тестирования ДНК, предоставляя возможность проведения широкомасштабных исследований, в частно-

сти изучения вклада мутаций в генах наследственного рака в общую заболеваемость РМЖ и РЯ, а также анализа распространенности соответствующих генных дефектов у здоровых женщин [11].

ЭПИДЕМИОЛОГИЯ МУТАЦИЙ *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2* И *NBS1* В РОССИИ

Российские исследования синдрома наследственного РМЖ/РЯ начались с некоторым отставанием от США и Европы и привели к совершенно неожиданным результатам. Первая работа в данной области была опубликована в 1997 г., в ней обследовали больных с семейными формами РЯ, проживающих в Москве или некоторых других регионах постсоветского пространства [12]. Главный итог этой работы – вывод об исключительно частой встречаемости мутации *BRCA1* 5382insC. Как упоминалось выше, эту мутацию впервые описали у женщин еврейского происхождения, поэтому она долгое время упоминалась преимущественно в контексте именно этой этнической группы [13]. По-видимому, представления о еврейском происхождении мутации *BRCA1* 5382insC не совсем верны. Эта мутация обнаруживается не только у жителей различных регионов России, но и у коренного населения Польши, Литвы, Латвии, Белоруссии [14–17]. Вероятно, более уместно говорить о славянском происхождении *BRCA1* 5382insC, а относительно частое обнаружение данного варианта у евреев ашкенази, наблюдаемое преимущественно в Восточной Европе, по-видимому, обусловлено длительным сосуществованием славян и евреев на территории Прибалтики и некоторых сопряженных территорий.

Эпидемиология мутации *BRCA1* 5382insC вызывает по меньшей мере удивление, так как она противоречит устоявшимся представлениям о многовековом «смешении кровей» на территории Российской империи и Советского Союза. *BRCA1* 5382insC составляет до 90% всех мутаций гена *BRCA1* у женщин, проживающих в достаточно отдаленных друг от друга регионах России – Москве, С.-Петербурге, Краснодаре, Томске и т.д. [12, 18–20, 22–24, 26]. Более того, эта мутация доминирует в перечисленных выше пограничных государствах с преимущественно славянским населением – в Польше, Белоруссии, Латвии и Литве [14–17]. Примечательно, что данные об относительной генетической гомогенности славян в целом согласуются с результатами популяционных исследований, посвященных общим вопросам генного разнообразия у жителей нашей страны [31]. Встречаемость аллеля *BRCA1* 5382insC у здоровых женщин составляет примерно 0.1%. Этот вариант отвечает примерно за 2–5% всех случаев РМЖ. Среди входящих в группу «высокого риска» больных, а именно при наличии в анамнезе семейной онкопатологии, при билатераль-

Гены наследственного рака молочной железы (РМЖ) и рака яичника (РЯ) в России

Ген	Основные мутации	Встречаемость, %				Ссылка
		у здоровых женщин	у больных РМЖ с клиническими признаками наследственного рака	у «случайных» больных РМЖ	у больных РЯ	
<i>BRCA1</i>	5382insC, 4153delA, 185delAG	~0.1	~10	2-4	> 10	[18–26]
<i>CHEK2</i>	1100delC, IVS2+1G>A	< 1	~5	~2	< 1	[26–29]
<i>NBS1</i>	657del5	0.5	~1	0.7	< 1	[29, 30]

ном поражении молочных желез или раннем начале заболевания, эта мутация обнаруживается в каждом десятом случае. Еще примечательнее вклад аллеля *BRCA1* 5382insC в заболеваемость РЯ: эту мутацию находят более чем у 10–15% больных данной категории (таблица). Существенно, что в отличие от РМЖ, распределение варианта *BRCA1* 5382insC у женщин с РЯ не зависит ни от возраста, ни от семейного анамнеза, ни от количества первичных опухолевых очагов [26]. Поэтому, если в случае РМЖ можно обсуждать целесообразность приоритетного ДНК-тестирования тех больных, у которых имеются клинические проявления наследственного РМЖ, то само по себе обнаружение злокачественного поражения яичников служит основанием для лабораторного генетического обследования.

В упоминавшейся выше пионерской работе [12] также описана относительно частая встречаемость мутации *BRCA1* 4153delA (4154delA). Эта мутация выявляется не только у больных из различных регионов России, но и в перечисленных выше пограничных славянских государствах [14–17]. Тем не менее частота *BRCA1* 4153delA у российских больных на порядок ниже частоты *BRCA1* 5382insC, поэтому отдельное изучение эпидемиологии этой мутации представляется по меньшей мере затруднительным. Польские ученые опубликовали данные о предпочтительной ассоциации *BRCA1* 4153delA с РЯ [14, 32], однако это наблюдение не было воспроизведено в дальнейшем [21].

Многие российские исследования показывают относительно частую встречаемость «еврейского» аллеля *BRCA1* 185delAG у российских больных [20, 23, 24, 26]. Однако эта мутация, в отличие от *BRCA1* 5382insC, не является доминирующей, поэтому ее присутствие скорее можно объяснить межэтническими браками.

Мутационный статус гена *BRCA1* у больных с семейным РМЖ/РЯ неоднократно анализировали посредством секвенирования всех кодирующих участков. Сходные результаты получены в исследованиях, проведенных в Москве, С.-Петербурге и Томске. По-

казано, что мутации, не относящиеся к категории повторяющихся, встречаются в России значительно реже, чем в странах Европы и в Северной Америке [12, 18–20, 23, 33]. Тем не менее стремительное упрощение и удешевление технологий ДНК-анализа позволяют предположить, что в недалеком будущем полное секвенирование гена *BRCA1* станет настолько доступным, что будет применяться даже при относительно низкой вероятности обнаружения генного дефекта. Крупные перестройки гена *BRCA1* анализировали всего в одной работе. Полученные данные указывают на невысокую частоту подобных мутаций у российских больных с наследственным РМЖ/РЯ [33].

В то время как ген *BRCA1* подвергался относительно систематическому анализу, сведения об эпидемиологии мутаций *BRCA2* в России носят отрывочный характер. Несколько случаев инактивации *BRCA2* обнаружено у больных семейным РМЖ/РЯ из Сибири [18], в то время как московские специалисты указывают на непричастность данного гена к онкологической заболеваемости в Европейской части России [23]. Следует заметить, что польскими учеными опубликованы результаты исчерпывающих работ в данной области, которые также указывают на незначительный вклад мутаций *BRCA2* в этиологию РМЖ и РЯ у славян [34].

Интересная особенность российских больных – частая встречаемость мутаций в гене *CHEK2*. Этот ген, так же как *BRCA1* и *BRCA2*, принимает участие в поддержании стабильности генома. Гетерозиготное носительство мутаций *CHEK2* достаточно часто наблюдается в Финляндии, Нидерландах, Польше и некоторых других странах [14, 35]. В Российской Федерации мутации *CHEK2* находят не менее чем у 2% «случайных» больных РМЖ, а при отборе по клиническим признакам семейного рака этот показатель возрастает как минимум до 5% [27]. В отличие от *BRCA1* и *BRCA2*, гетерозиготная инактивация *CHEK2* не сопровождается повышением риска РЯ [21, 26].

Еще один значимый для России ген – *NBS1* (*NBN*). Гомозиготные дефекты этого гена обнаружили при изучении тяжелейшего иммунодефицита – так на-

зываемого Nijmegen breakage syndrome [36]. Гетерозиготное носительство мутаций *NBS1* наблюдается преимущественно у славян. Оно ассоциировано с повышенным риском РМЖ [30, 37, 38]. У больных РЯ не наблюдается повышения частоты нарушений данного гена [26]. Тем не менее в единственном описанном случае сочетанной наследственной гетерозиготности генов *BRCA1* и *NBS1* в опухоли яичника отмечалась соматическая инактивация именно гена *NBS1*, в то время как статус гена *BRCA1* оставался интактным [39]. Подобное наблюдение может служить определенным аргументом в пользу причастности гена *NBS1* к формированию риска РЯ.

МЕДИЦИНСКИЕ АСПЕКТЫ НАСЛЕДСТВЕННОГО РМЖ/РЯ: РОССИЙСКАЯ СПЕЦИФИКА

Главной целью диагностики наследственных раковых синдромов является поиск здоровых женщин, носительниц соответствующих мутаций. Предполагается, что своевременное выявление генного дефекта позволит предотвратить летальный исход от онкологического заболевания. Женщин с гетерозиготностью по генам *BRCA1* и *BRCA2* регулярно обследуют с целью ранней диагностики РМЖ и РЯ. Помимо этого, носительницам мутаций в генах *BRCA* рекомендуется проведение профилактических операций, направленных на удаление тканей-мишеней [40].

Здоровые носительницы генов наследственного рака обычно обнаруживаются в процессе обследования родственниц больных с РМЖ или РЯ, у которых при генетическом консультировании обнаружен генный дефект. По существующим правилам инициатива приглашения членов семьи на ДНК-анализ должна принадлежать самой больной. Как показывает наша практика, возможностью ДНК-тестирования пользуются далеко не все родственницы носительниц мутаций в генах *BRCA*. Можно предположить, что либо сами больные неохотно предоставляют своим близким информацию об обнаружении у них наследственного заболевания, либо здоровые женщины попросту избегают медицинских мероприятий, направленных на уточнение индивидуального онкологического риска. Еще более неожиданно, что большинство находящихся у нас на мониторинге здоровых женщин с

BRCA1-мутациями проявляют удивительную недисциплинированность в отношении профилактических обследований. В наивысшей степени болезненным представляется вопрос о профилактических операциях. В то время как превентивная хирургия считается компонентом повседневной клинической практики в США, Канаде, Западной и Восточной Европе, Израиле, Австралии, ЮАР, Японии, Южной Корее и т.д., в России обсуждение данной проблемы замалчивается или извращается не только обывателями, но и медицинским сообществом.

Помимо негативных, следует отметить и позитивные аспекты, связанные с синдромом наследственного РМЖ/РЯ у нас в стране. В 2009 г. польские ученые опубликовали результаты клинического исследования, показавшие уникальную чувствительность опухолей, ассоциированных с *BRCA1*, к цисплатину [41]. Подобный эффект связан с наличием уникального терапевтического окна. В опухолях у носительниц мутаций в гене *BRCA1* наблюдается полная инактивация упомянутого гена, что приводит к дефекту гомологичной рекомбинации. *BRCA1*-дефицитные клетки исключительно уязвимы для цисплатина – препарата, вызывающего одно- и двунигетивные разрывы ДНК. Существенно, что нормальные ткани, в отличие от опухолевых, сохраняют гетерозиготный статус *BRCA1*, причем наличия единственной функциональной копии данного гена достаточно для выполнения его функций. Специалистам из нашей страны принадлежит первая публикация, независимо подтвердившая результаты Byrski и сотр. [42]. Более того, российские врачи одни из первых в мире превратили *BRCA1*-тест в рутинный компонент выбора тактики химиотерапии РМЖ и РЯ. Уже сейчас цисплатин стал приоритетным средством химиотерапии *BRCA1*-ассоциированных опухолей в целом ряде медицинских учреждений страны. ●

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки (контракт 02.740.11.0780), Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 08-04-00369, 09-04-90402, 10-04-92110, 10-04-92601) и Правительства Москвы (проект 15/10-Ген-М).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Benson J.R., Jatoi I., Keisch M., Esteva F.J., Makris A., Jordan V.C. // *Lancet*. 2009. V. 373. P. 1463–1479.
2. Kristensen G.B., Tropé C. // *Lancet*. 1997. V. 349. P. 113–117.
3. Narod S.A., Foulkes W.D. // *Nat. Rev. Cancer*. 2004. V. 4. P. 665–676.
4. Miki Y., Swensen J., Shattuck-Eidens D., Futreal P.A., Harshman K., Tavtigian S., Liu Q., Cochran C., Bennett L.M., Ding W., Bell R., Rosenthal J., Hussey C., Tran T., McClure M., Frye C.,

- Hattier T., Phelps R., Haugen-Strano A., Katcher H., Yakumo K., Gholami Z., Shaffer D., Stone S., Bayer S., Wray C., Bogden R., Dayananth P., Ward J., Tonin P., Narod S., Bristow P.K., Norris F.H., Helvering L., Morrison P., Rosteck P., Lai M., Barrett J.C., Lewis C., Neuhausen S., Cannon-Albright L., Goldgar D., Wiseman R., Kamb A., Skolnick M.H. // *Science*. 1994. V. 266. P. 66–71.
5. Wooster R., Bignell G., Lancaster J., Swift S., Seal S., Mangion J., Collins N., Gregory S., Gumbs C., Micklem G. // *Nature*. 1995. V. 378. P. 789–792.

6. Gudmundsdottir K., Ashworth A. // *Oncogene*. 2006. V. 25. P. 5864–5874.
7. Oldenburg R.A., Meijers-Heijboer H., Cornelisse C.J., Devilee P. // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2007. V. 63. P. 125–149.
8. Fackenthal J.D., Olopade O.I. // *Nat. Rev. Cancer*. 2007. V. 7. P. 937–948.
9. Neuhausen S.L. // *Breast Cancer Res.* 2000. V. 2. P. 77–81.
10. Ferla R., Calò V., Cascio S., Rinaldi G., Badalamenti G., Carrecia I., Surmacz E., Colucci G., Bazan V., Russo A. // *Ann. Oncol.* 2007. V. 18. Suppl. 6. P. vi93–vi98.
11. Abbott A. // *Nature*. 2000. V. 406. P. 340–342.
12. Gayther S.A., Harrington P., Russell P., Kharkevich G., Garkavtseva R.F., Ponder B.A. // *Am. J. Hum. Genet.* 1997. V. 60. P. 1239–1242.
13. Roa B.B., Boyd A.A., Volcik K., Richards C.S. // *Nat. Genet.* 1996. V. 14. P. 185–187.
14. Górski B., Cybulski C., Huzarski T., Byrski T., Gronwald J., Jakubowska A., Stawicka M., Gozdecka-Grodecka S., Szwiec M., Urbański K., Mituś J., Marczyk E., Dziuba J., Wandzel P., Surdyka D., Haus O., Janiszewska H., Debiak T., Tołoczko-Grabarek A., Medrek K., Masojć B., Mierzejewski M., Kowalska E., Narod S.A., Lubiński J. // *Breast Cancer Res. Treat.* 2005. V. 92. P. 19–24.
15. Tikhomirova L., Sinicka O., Smite D., Eglitis J., Hodgson S.V., Stengrevics A. // *Fam. Cancer*. 2005. V. 4. P. 77–84.
16. Elsakov P., Kurtinaitis J., Petratis S., Ostapenko V., Razumas M., Razumas T., Meskauskas R., Petrulis K., Luksite A., Lubiński J., Górski B., Narod S.A., Gronwald J. // *Clin. Genet.* 2010. V. 78. P. 373–376.
17. Uglanitsa N., Oszurek O., Uglanitsa K., Savonievich E., Lubiński J., Cybulski C., Debiak T., Narod S.A., Gronwald J. // *Clin. Genet.* 2010 (in press).
18. Tereschenko I.V., Basham V.M., Ponder B.A., Pharoah P.D. // *Hum. Mutat.* 2002. V. 19. P. 184.
19. Grudinina N.A., Golubkov V.I., Tikhomirova O.S., Brezhneva T.V., Hanson K.P., Vasilyev V.B., Mandelshtam M.Y. // *Russ. J. Genet.* 2005. V. 41. P. 318–322.
20. Loginova A.N., Pospekhova N.I., Lyubchenko L.N., Budilov A.V., Zakhar'ev V.M., Gar'kavtseva R.F., Ginter E.K., Karpukhin A.V. // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2003. V. 136. P. 276–278.
21. Krylova N.Y., Lobeiko O.S., Sokolenko A.P., Iyevleva A.G., Rozanov M.E., Mitiushkina N.V., Gergova M.M., Porhanova T.V., Urmancheyeva A.F., Maximov S.Y., Togo A.V., Imyanotov E.N. // *Hered. Cancer. Clin. Pract.* 2006. V. 4. P. 193–196.
22. Sokolenko A.P., Mitiushkina N.V., Buslov K.G., Bit-Sava E.M., Iyevleva A.G., Chekmariova E.V., Kuligina E.Sh., Ulibina Y.M., Rozanov M.E., Suspitsin E.N., Matsko D.E., Chagunava O.L., Trofimov D.Y., Devilee P., Cornelisse C., Togo A.V., Semiglazov V.F., Imyanotov E.N. // *Eur. J. Cancer.* 2006. V. 42. P. 1380–1384.
23. Smirnova T.Y., Pospekhova N.I., Lyubchenko L.N., Tjulandin S.A., Gar'kavtseva R.F., Ginter E.K., Karpukhin A.V. // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2007. V. 144. P. 83–85.
24. Sokolenko A.P., Rozanov M.E., Mitiushkina N.V., Sherina N.Y., Iyevleva A.G., Chekmariova E.V., Buslov K.G., Shilov E.S., Togo A.V., Bit-Sava E.M., Voskresenskiy D.A., Chagunava O.L., Devilee P., Cornelisse C., Semiglazov V.F., Imyanotov E.N. // *Fam. Cancer*. 2007. V. 6. P. 281–286.
25. Mitrofanov D.V., Chasovnikova O.B., Kovalenko S.P., Liakhovich V.V. // *Mol. Biol. (Mosk)*. 2009. V. 43. P. 930–936.
26. Suspitsin E.N., Sherina N.Y., Ponomariova D.N., Sokolenko A.P., Iyevleva A.G., Gorodnova T.V., Zaitseva O.A., Yatsuk O.S., Togo A.V., Tkachenko N.N., Shiyonov G.A., Lobeiko O.S., Krylova N.Y., Matsko D.E., Maximov S.Y., Urmancheyeva A.F., Porhanova N.V., Imyanotov E.N. // *Hered. Cancer Clin. Pract.* 2009. V. 7. P. 5.
27. Chekmariova E.V., Sokolenko A.P., Buslov K.G., Iyevleva A.G., Ulibina Y.M., Rozanov M.E., Mitiushkina N.V., Togo A.V., Matsko D.E., Voskresenskiy D.A., Chagunava O.L., Devilee P., Cornelisse C., Semiglazov V.F., Imyanotov E.N. // *Breast Cancer Res. Treat.* 2006. V. 100. P. 99–102.
28. Fedorova O.E., Liubchenko L.N., Paiadini Iu.G., Kazubskaja T.P., Amosenko F.A., Gar'kavtseva R.F., Zasedatelev A.S., Nasedkina T.V. // *Mol. Biol. (Mosk)*. 2007. V. 41. P. 32–36.
29. Krylova N.Y., Ponomariova D.N., Sherina N.Y., Ogorodnikova N.Y., Logvinov D.A., Porhanova N.V., Lobeiko O.S., Urmancheyeva A.F., Maximov S.Y., Togo A.V., Suspitsin E.N., Imyanotov E.N. // *Hered. Cancer. Clin. Pract.* 2007. V. 5. P. 153–156.
30. Buslov K.G., Iyevleva A.G., Chekmariova E.V., Suspitsin E.N., Togo A.V., Kuligina E.Sh., Sokolenko A.P., Matsko D.E., Turkevich E.A., Lazareva Y.R., Chagunava O.L., Bit-Sava E.M., Semiglazov V.F., Devilee P., Cornelisse C., Hanson K.P., Imyanotov E.N. // *Int. J. Cancer*. 2005. V. 114. P. 585–589.
31. Balanovsky O., Rootsi S., Pshenichnov A., Kivisild T., Churnosov M., Evseeva I., Pocheshkhova E., Boldyreva M., Yankovsky N., Balanovska E., Vilems R. // *Am. J. Hum. Genet.* 2008. V. 82. P. 236–250.
32. Menkiszak J., Gronwald J., Górski B., Jakubowska A., Huzarski T., Byrski T., Foszczyńska-Kłoda M., Haus O., Janiszewska H., Perkowska M., Brozek I., Grzybowska E., Zientek H., Góźdź S., Kozak-Klonowska B., Urbański K., Mitorski R., Kowalczyk J., Pluzańska A., Niepsuj S., Koc J., Szwiec M., Drosik K., Mackiewicz A., Lamperska K., Strózyk E., Godlewski D., Stawicka M., Waśko B., Bebenek M., Rozmiarek A., Rzepka-Górska I., Narod S.A., Lubiński J. // *Int. J. Cancer*. 2003. V. 106. P. 942–945.
33. Iyevleva A.G., Suspitsin E.N., Kroeze K., Gorodnova T.V., Sokolenko A.P., Buslov K.G., Voskresenskiy D.A., Togo A.V., Kovalenko S.P., van der Stoep N., Devilee P., Imyanotov E.N. // *Cancer Lett.* 2010. V. 298. P. 258–263.
34. Górski B., Byrski T., Huzarski T., Jakubowska A., Menkiszak J., Gronwald J., Pluzańska A., Bebenek M., Fischer-Maliszewska L., Grzybowska E., Narod S.A., Lubiński J. // *Am. J. Hum. Genet.* 2000. V. 66. P. 1963–1968.
35. *CHEK2* Breast Cancer Case-Control Consortium. // *Am. J. Hum. Genet.* 2004. V. 74. P. 1175–1182.
36. Varon R., Seemanova E., Chrzanowska K., Hnateyko O., Piekutowska-Abramczuk D., Krajewska-Walasek M., Sykut-Cegielska J., Sperling K., Reis A. // *Eur. J. Hum. Genet.* 2000. V. 8. P. 900–902.
37. Steffen J., Nowakowska D., Niwińska A., Czapczak D., Kluska A., Piatkowska M., Wiśniewska A., Paszko Z. // *Int. J. Cancer*. 2006. V. 119. P. 472–475.
38. Bogdanova N., Feshchenko S., Schürmann P., Waltes R., Wieland B., Hillemanns P., Rogov Y.I., Dammann O., Bremer M., Karstens J.H., Sohn C., Varon R., Dörk T. // *Int. J. Cancer*. 2008. V. 122. P. 802–806.
39. Porhanova N.V., Sokolenko A.P., Sherina N.Y., Ponomariova D.N., Tkachenko N.N., Matsko D.E., Imyanotov E.N. // *Cancer Genet. Cytogenet.* 2008. V. 186. P. 122–124.
40. Dent R., Warner E. // *Semin. Oncol.* 2007. V. 34. P. 392–400.
41. Byrski T., Huzarski T., Dent R., Gronwald J., Zuziak D., Cybulski C., Kladny J., Gorski B., Lubinski J., Narod S.A. // *Breast Cancer Res. Treat.* 2009. V. 115. P. 359–363.
42. Moiseyenko V.M., Protsenko S.A., Brezhnev N.V., Maximov S.Y., Gershveld E.D., Hudyakova M.A., Lobeiko O.S., Gergova M.M., Krzhivitskiy P.I., Semionov I.I., Matsko D.E., Iyevleva A.G., Sokolenko A.P., Sherina N.Y., Kuligina E.Sh., Suspitsin E.N., Togo A.V., Imyanotov E.N. // *Cancer Genet. Cytogenet.* 2010. V. 197. P. 91–94.

УДК 575.18:577.218:576.316

Дозовая компенсация генов половых хромосом у эукариот

Е. В. Дементьева^{1,2}, С. М. Закиян^{1,2,3*}¹Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. ак. Лаврентьева, 10²Учреждение Российской академии наук Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. ак. Лаврентьева, 8³Научный центр клинической и экспериментальной медицины СО РАМН, 630117, Новосибирск, ул. ак. Тимакова, 2

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

Поступила в редакцию 24.09.2010 г.

РЕФЕРАТ Эволюция половых хромосом, сопровождающаяся их значительной дивергенцией по морфологии и генному составу, привела к тому, что большинство генов одной из половых хромосом оказались представленными в двух дозах у одного пола и в одной дозе у другого. Для того чтобы устранить различия в уровне экспрессии этих генов между полами и восстановить одинаковый уровень экспрессии генов на половых хромосомах и аутосомах, возникли механизмы дозовой компенсации. Исследования трех уже ставших классическими объектов: *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* и млекопитающих – показывают, что дозовая компенсация генов X-хромосомы может осуществляться с помощью совершенно разных механизмов, действующих на хромосомном уровне. Однако сравнительно недавно были получены данные об экспрессии генов половых хромосом у птиц и бабочек, из которых следует, что многие гены половых хромосом могут экспрессироваться на разных уровнях у самок и самцов. В обзоре представлена информация о механизмах дозовой компенсации у *D. melanogaster*, *C. elegans* и млекопитающих, а также обсуждаются новые данные об экспрессии генов половых хромосом у птиц и бабочек и их влияние на наше представление о дозовой компенсации.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА дозовая компенсация, половые хромосомы, экспрессия генов, инактивация X-хромосомы.

КОЭВОЛЮЦИЯ ПОЛОВЫХ ХРОМОСОМ И ДОЗОВОЙ КОМПЕНСАЦИИ

У целого ряда организмов половая принадлежность коррелирует с определенным сочетанием половых хромосом. Так, у *Drosophila melanogaster* и ряда млекопитающих половые хромосомы самок представлены двумя X-хромосомами, в то время как самцы являются гетерогаметным полом и имеют две различные половые хромосомы: X и Y. Тем не менее системы определения пола у *D. melanogaster* и млекопитающих принципиально различаются. У *D. melanogaster* пол зависит от соотношения дозы генов X-хромосомы и аутосом [1], в то время как для млекопитающих ключевым моментом является наличие Y-хромосомы, точнее гена *Sry*, ответственного за развитие по мужскому типу [2]. У птиц, бабочек и некоторых видов пресмыкающихся, напротив, гетерогаметным полом являются самки (Z- и W-хромосомы), а самцы имеют две Z-хромосомы.

Половые хромосомы X и Y, а также Z и W значительно отличаются друг от друга по размеру, морфологии и генетическому содержанию (рис. 1). Y- и W-хромосомы состоят в основном из формирующих гетерохроматин повторяющихся последовательностей ДНК и содержат незначительное по сравнению с X- и Z-хромосомами число генов.

Предполагается, что X- и Y-хромосомы в различных таксонах возникали независимо и ведут свое происхождение от пары гомологичных

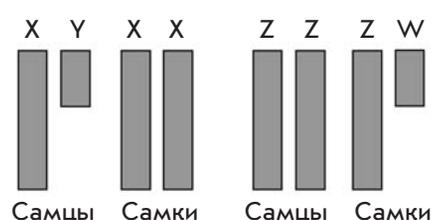


Рис. 1. Системы половых хромосом XY и ZW.

аутосом. Первым шагом в эволюции половых хромосом стало формирование генетической системы определения пола у популяции гермафродитных особей или особей, пол которых определяется температурными условиями. Считается, что наиболее логичной является последовательность событий, при которой сначала в результате мутации появился рецессивный ген мужской стерильности на будущей X-хромосоме, а затем доминантный ген женской стерильности на будущей Y-хромосоме. Следствием этого было подавление рекомбинации между X- и Y-хромосомами по данным локусам, что позволило обеспечить сцепление генов, ответственных за развитие особи по женскому и мужскому типу. Далее на Y-хромосоме стали накапливаться гены, дающие преимущество самцам, но при этом снижающие жизнеспособность самок. Необходимость тесного сцепления таких генов с Y-хромосомой приводила к подавлению рекомбинации между X- и Y-хромосомами в новых локусах и постепенному расширению нерекombинирующего района. Подавление рекомбинации способствовало накоплению мутаций и делеций в не связанных с формированием мужских признаков генах Y-хромосомы, что стало причиной их последующей деградации. Конечным результатом данного процесса может стать потеря всей Y-хромосомы, что, по-видимому, и произошло у самцов *Caenorhabditis elegans*, которые имеют только X-хромосому. Аналогичный процесс, вероятно, привел к дивергенции Z- и W-хромосом [3, 4].

Для того чтобы компенсировать столь существенную потерю генов на Y-хромосоме, отбор, по всей видимости, благоприятствовал механизмам, повышающим уровень экспрессии генов на X-хромосоме самцов [5]. Удвоение уровня экспрессии генов на единственной X-хромосоме самцов было достаточно давно известно и хорошо изучено у *D. melanogaster* [6]. Аналогичный способ восстановления уровня экспрессии генов X-хромосомы (дозовой компенсации) предполагался также для самцов млекопитающих и *C. elegans*, но убедительные доказательства его существования долгое время не удавалось получить. Гипотеза об удвоении уровня экспрессии генов X-хромосомы у самцов млекопитающих и *C. elegans* окончательно подтвердилась сравнительно недавно, когда широкое распространение получил метод микрочипов. Использование этого метода позволило измерить средний уровень экспрессии генов X-хромосомы и аутосом и показать, что у самцов млекопитающих и *C. elegans* гены одной X-хромосомы действительно экспрессируются на одинаковом уровне с аутосомными [7–9].

Возрастание уровня транскрипции генов на X-хромосоме могло привести к избытку их про-

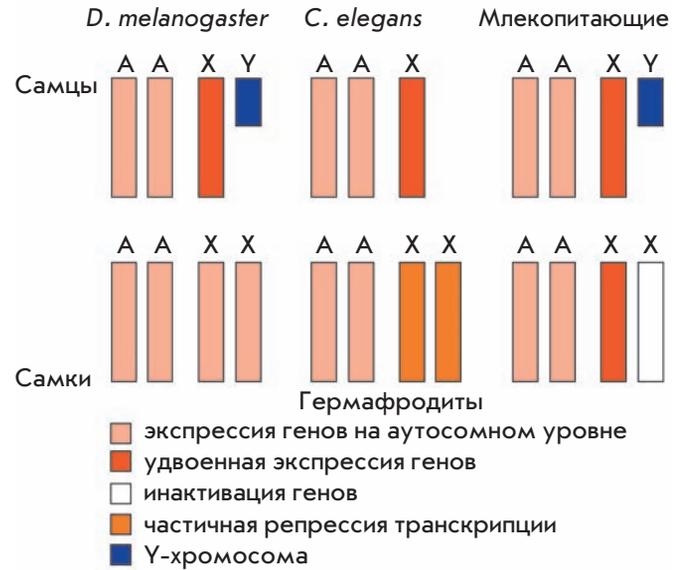


Рис. 2. Разнообразие способов дозовой компенсации генов X-хромосомы. А – набор аутосом, X и Y – половые хромосомы.

дуктов у самок. Однако исследования экспрессии генов методом микрочипов показали, что у самок *D. melanogaster*, *C. elegans* и млекопитающих гены X-хромосомы также экспрессируются на одном уровне с аутосомными [7–9]. Следовательно, и у самок должны были появиться механизмы, позволяющие поддерживать транскрипционный баланс между генами X-хромосомы и аутосом, а также равный уровень экспрессии генов X-хромосомы между полами. Несмотря на общность причин возникновения, дозовая компенсация генов X-хромосомы у *D. melanogaster*, *C. elegans* и млекопитающих осуществляется различными способами (рис. 2). Так, у *D. melanogaster* дозовая компенсация генов происходит только у самцов, а гены обеих X-хромосом самок экспрессируются на одном уровне с аутосомными [7]. У *C. elegans* удвоение уровня экспрессии генов наблюдается как на X-хромосоме у самцов, так и на обеих X-хромосомах у гермафродитов. Восстановление транскрипционного баланса у гермафродитов достигается за счет специфического механизма, частично подавляющего уровень экспрессии генов одновременно на обеих X-хромосомах [7]. У млекопитающих повышенная экспрессия генов происходит на X-хромосоме самцов, а также на одной из двух X-хромосом самок. На второй X-хромосоме транскрипция большинства генов подавляется, т.е. X-хромосома подвергается инактивации [7, 8]. На механизмах, лежащих в основе данных процессов, стоит остановиться более подробно.

ДОЗОВАЯ КОМПЕНСАЦИЯ ГЕНОВ X-ХРОМОСОМЫ**У *D. melanogaster***

Повышенный уровень экспрессии генов на X-хромосоме самцов *D. melanogaster* обеспечивается с помощью комплекса, состоящего из шести белков: MSL1 (male-specific lethal 1), MSL2, MSL3, MOF (males absent on the first), MLE (maleless), JIL1 (Janus kinase 1) – и двух некодирующих РНК: *roX1* и *roX2* (RNA on the X). Ключевым для сборки данного комплекса является белок MSL2, который синтезируется только у самцов. У самок MSL2 отсутствует, и в результате остальные компоненты не способны собираться в комплекс дозовой компенсации. Согласно общепринятой модели MSL2 посредством прямого взаимодействия стабилизирует MSL1, таким образом формируя платформу для дальнейшей сборки комплекса дозовой компенсации [10]. За активацию транскрипции генов X-хромосомы самцов в MSL-комплексе отвечают белки MOF и JIL1. Белок MOF ацетилирует гистон H4 по лизину в 16-м положении (H4K16). Эта модификация характерна для транскрипционно активного хроматина и специфична для X-хромосомы самцов [11, 12]. Однако в последнее время стали появляться данные о том, что MOF может ацетилировать H4K16 не только на X-хромосоме, но и на аутосомах, причем у обоих полов [13]. В подтверждение этих предположений было обнаружено, что MOF взаимодействует не только с MSL-комплексом, но и с так называемым NSL (nonspecific lethal)-комплексом, который связывается с промоторами транскрипционно активных генов на аутосомах у самцов, а также на аутосомах и половых хромосомах у самок. Следовательно, посредством взаимодействия с различными белковыми комплексами MOF принимает участие в двух процессах: дозовой компенсации генов X-хромосомы у самцов и общей регуляции транскрипции генов у *D. melanogaster* [14, 15]. Более того, гомологи MOF и NSL-комплекса существуют также у млекопитающих и выполняют ту же самую функцию – ацетилирование гистона H4 [16, 17]. Эти факты указывают на то, что механизм дозовой компенсации у *D. melanogaster* не возник *de novo*, а под эту цель были адаптированы уже существующие белки, которые могут сохранять свою первоначальную функцию. Киназа JIL1 свободно ассоциирована с MSL-комплексом и осуществляет фосфорилирование гистона H3 по серину в 10-м положении. Данная модификация также участвует в формировании транскрипционно активного хроматина, вероятно, препятствуя связыванию гетерохроматинового белка HP1 [18, 19]. Таким образом, повышенная экспрессия генов X-хромосомы у *D. melanogaster* достигается за счет создания «открытой», декомпактизованной, доступной для фак-

торов транскрипции структуры хроматина [20]. Считается, что РНК-ДНК-геликаза MLE способствует интеграции *roX1* и *roX2* РНК в комплекс дозовой компенсации [10]. Данные РНК необходимы для связывания комплекса дозовой компенсации с X-хромосомой [21] и являются взаимозаменяемыми. Интересно, что человеческий гомолог MSL-комплекса не содержит *roX1* и *roX2* РНК. Это означает, что включение этих некодирующих РНК в состав MSL-комплекса могло стать ключевым моментом в формировании механизма дозовой компенсации у *D. melanogaster* [22].

Для специфичного связывания комплекса дозовой компенсации на X-хромосоме *D. melanogaster* существует не менее 150 особых сайтов, так называемых chromatin entry sites, которые содержат опознаваемые MSL-комплексом последовательности – MSL recognition elements. После связывания MSL-комплекса с данными сайтами начинается его распространение вдоль X-хромосомы и взаимодействие с активно транскрибируемыми генами [23]. На этой стадии значение, скорее всего, имеют не нуклеотидные последовательности, а эпигенетические характеристики, в частности триметилированный по лизину в 36-м положении гистон H3, отличительный признак транскрибирующихся генов [24]. Тем не менее не все транскрипционно активные гены X-хромосомы самцов *D. melanogaster* связываются с комплексом дозовой компенсации. Более того, связывание с MSL-комплексом далеко не всегда приводит именно к двукратному увеличению уровня экспрессии генов X-хромосомы, причем в ряде случаев уровень транскрипции практически не меняется [25–27]. Так что механизм, с помощью которого регулируется уровень экспрессии индивидуальных генов X-хромосомы самцов *D. melanogaster*, еще предстоит выяснить.

Механизм, лежащий в основе удвоения уровня экспрессии генов X-хромосомы у самцов млекопитающих и *C. elegans*, в настоящее время не известен. Вероятно, повышенная экспрессия генов X-хромосомы обеспечивается, как и у *D. melanogaster*, эпигенетическими механизмами. Правда, следует отметить, что пока не было обнаружено каких-либо принципиальных различий в структуре хроматина между X-хромосомой и аутосомами. Поэтому повышенная экспрессия генов X-хромосомы у самцов может быть обусловлена изменениями нуклеотидных последовательностей их регуляторных районов в ходе эволюции [8, 28]. Кроме того, у млекопитающих возможен еще один способ усиления экспрессии генов X-хромосомы. Дело в том, что гены активной и неактивной X-хромосом самок млекопитающих имеют различный характер метилирования. Аллели неактивной X-хромосомы гиперметилированы по CpG-

динуклеотидам промоторных областей, что согласуется с их инактивацией. В то же время аллели активной X-хромосомы и гены X-хромосомы самцов гиперметилированы по CpG-динуклеотидам в структурной части [29]. Однако то, каким образом метилирование структурной части генов X-хромосомы может приводить к более высокому уровню их экспрессии у млекопитающих, остается совершенно непонятным.

ДОЗОВАЯ КОМПЕНСАЦИЯ ГЕНОВ X-ХРОМОСОМЫ У *C. elegans*

Как уже упоминалось ранее, дозовая компенсация генов X-хромосомы у *C. elegans* включает два процесса: удвоение уровня экспрессии генов на X-хромосоме у самцов и частичное подавление экспрессии генов на обеих X-хромосомах у гермафродитов. В то время как механизм первого процесса совершенно неизвестен, показано, что у гермафродитов *C. elegans* существует комплекс дозовой компенсации, состоящий из девяти белков: SDC-1, SDC-2, SDC-3, DPY-21, DPY-26, DPY-27, DPY-28, DPY-30, MIX1 [30]. Три белка (DPY-26, DPY-27, DPY-28) очень сходны с белками 13S конденсинового комплекса, который отвечает за компактизацию хромосом в митозе и мейозе не только у *C. elegans*, но и у остальных эукариот, а еще один белок – MIX1 (mitosis and X-associated protein 1) – является общим для обоих комплексов [31–34]. Однако не только MIX1 выполняет двойную функцию. Так, DPY-28 регулирует число и распределение кроссоверов между гомологичными хромосомами в мейозе [35]. DPY-30 входит в состав комплекса, гомологичного комплексу Set1/COMPASS дрожжей, который осуществляет метилирование гистона H3. Очевидно, что DPY-30 принимает участие как в дозовой компенсации, так и в общей регуляции транскрипции генов у самцов и гермафродитов *C. elegans* [36, 37]. Важную роль в сборке и функционировании комплекса дозовой компенсации играет белок SDC-2 (sex determination and dosage compensation 2). В отличие от остальных белков, SDC-2 экспрессируется только у гермафродитов и, по-видимому, отвечает за специфичное действие комплекса дозовой компенсации на X-хромосому, поскольку может связываться с X-хромосомой независимо от других участников комплекса [38]. Сборка комплекса начинается с взаимодействия SDC-2, SDC-3 и DPY-30, которые создают плацдарм для связывания всех остальных белков с X-хромосомой [39–41]. Интересно, что тот же самый комплекс (за исключением DPY-21) участвует в 20-кратной репрессии транскрипции аутосомного гена *her-1* (hermaphroditization of XO animals), который отвечает за развитие по мужскому типу [38, 41], т.е. данный комплекс задействован не только в дозо-

вой компенсации генов X-хромосомы, но и в системе определения пола.

Для связывания комплекса дозовой компенсации на X-хромосоме *C. elegans* существуют специальные последовательности, но их плотность значительно ниже, чем у *D. melanogaster* (~40 против 150). Эти последовательности можно разделить на два типа: rex- и dox-сайты. Rex (recruitment elements on X)-сайты способны связываться с комплексом дозовой компенсации независимо от того, локализируются они на X-хромосоме или аутосомах, и, скорее всего, отвечают за первичное узнавание комплекса дозовой компенсации. Dox (dependent on X)-сайты взаимодействуют с комплексом дозовой компенсации, только находясь на X-хромосоме, и участвуют, главным образом, в распространении комплекса дозовой компенсации вдоль X-хромосом гермафродитов *C. elegans* [42].

Механизм, с помощью которого комплекс дозовой компенсации частично подавляет экспрессию генов X-хромосомы у гермафродитов, пока еще не установлен, но сходство комплекса дозовой компенсации *C. elegans* с 13S конденсиновым комплексом позволяет предполагать, что для репрессии транскрипции генов X-хромосом используется тот же принцип, что и при конденсации хромосом в митозе и мейозе [37]. Сходство с 13S конденсиновым комплексом и двойная функция некоторых белков комплекса дозовой компенсации свидетельствуют в пользу того, что у *C. elegans*, как и у *D. melanogaster*, дозовая компенсация возникла не за счет создания совершенно нового механизма, а за счет приобретения новых функций уже существующими белками. Неизвестным также остается и то, какие гены X-хромосомы и в какой степени подвержены действию механизмов дозовой компенсации у гермафродитов *C. elegans*.

ДОЗОВАЯ КОМПЕНСАЦИЯ ГЕНОВ X-ХРОМОСОМЫ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Как и в случае с *C. elegans*, у млекопитающих удвоение уровня экспрессии генов X-хромосомы происходит у обоих полов. Восстановление транскрипционного баланса генов у самок достигается с помощью транскрипционной репрессии (инактивации) большинства генов на одной из двух X-хромосом [43]. Инактивация X-хромосомы бывает случайной и импринтированной [28]. При импринтированной инактивации транскрипционной репрессии подвергается преимущественно X-хромосома, унаследованная от отца. Этот вариант инактивации встречается у сумчатых млекопитающих, а также в экстраэмбриональных тканях некоторых плацентарных млекопитающих. При случайной инактивации отцовская и материнская X-хромосомы имеют равные шансы

стать неактивными. Такой тип инактивации характерен для соматических тканей плацентарных млекопитающих.

На X-хромосоме плацентарных млекопитающих существует особый локус, называемый центром инактивации. Ключевым для инициации процесса инактивации является один из генов центра инактивации – *Xist*. С него считывается некодирующая РНК, которая затем распространяется вдоль будущей неактивной X-хромосомы, что приводит к целому ряду эпигенетических изменений [28, 44–46]. Вслед за распространением *Xist* РНК с инактивируемой X-хромосомы исключается РНК-полимераза II и появляются модифицирующие хроматин комплексы. В результате неактивная X-хромосома утрачивает модификации, характерные для транскрипционно активного хроматина, такие как диметилированный по лизину в 4-м положении гистон H3 (H3K4) и ацетилированные формы гистонов H3 и H4. Вместо них неактивная X-хромосома приобретает модификации, свойственные транскрипционно неактивному хроматину: триметилированный по лизину в 27-м положении гистон H3 (H3K27), убиквитинированный по лизину в 119-м положении гистон H2A (uH2A), диметилированный по лизину в 9-м положении гистон H3 (H3K9) и монометилированный по лизину в 20-м положении гистон H4 (H4K20). Кроме того, неактивная X-хромосома становится поздно реплицирующейся и ассоциируется с вариантом гистона H2A (макроH2A), содержащим негистоновый домен. Последним в цепи эпигенетических событий процесса инактивации является метилирование ДНК промоторных областей генов, что позволяет стабильно поддерживать неактивное состояние генов X-хромосомы самок млекопитающих принимают участие комплексы polycomb белков. Так, PRC1 (polycomb repressor complex 1) отвечает за убиквитинирование гистона H2A [47, 48], а PRC2 – за триметилирование H3K27 [49, 50]. Однако данные белковые комплексы не являются специфичными для самок и участвуют у обоих полов в репрессии генов не только на X-хромосоме, но и на аутосомах [22]. Ферменты, осуществляющие диметилирование H3K9 и монометилирование H4K20, точно неизвестны. Скорее всего, эти модификации хроматина устанавливаются соответственно метилтрансфераза G9a и белок PR-Set7 [51, 52]. Примечательно, что у млекопитающих, как и у *D. melanogaster*, в дозовой компенсации генов X-хромосомы принимают участие некодирующая РНК и модифицирующие хроматин комплексы, но их влияние на экспрессию генов оказывается диаметрально противоположным. Вопрос о том, каким образом *Xist* РНК взаимодействует

с модифицирующими хроматин факторами, до сих пор остается открытым. Более того, у сумчатых млекопитающих ген *Xist* так и не был найден [53], но спектр модификаций хроматина на неактивной X-хромосоме очень сходен с таковым у плацентарных. Становится понятным, что центр инактивации X-хромосомы, как и случайная инактивация, возник лишь у плацентарных млекопитающих [53, 54], а процесс инактивации у сумчатых и плацентарных млекопитающих должен различаться.

По своему механизму инактивация X-хромосомы очень похожа на импринтинг аутосомных генов. В обоих случаях задействованы некодирующие РНК, экспрессия которых приводит к установлению одинаковых модификаций хроматина: гипометилированного H3K4, гипоацетилированного H3K9, триметилированного H3K27, uH2A, диметилированного H3K9 и метилирования ДНК [55, 56]. Конечным результатом обоих процессов является подавление транскрипции одного из аллелей. Следовательно, способ транскрипционной репрессии генов при инактивации X-хромосомы у самок млекопитающих не является уникальным: тот же самый механизм используется и для установления моноаллельной экспрессии некоторых аутосомных генов.

Следует отметить, что не все гены неактивной X-хромосомы подвергаются инактивации. Исследования статуса экспрессии генов X-хромосомы человека показали, что 15% генов стабильно избегают инактивации и еще 10% генов имеют гетерогенную экспрессию, т.е. подвергаются инактивации у одних женщин и избегают инактивации у других [57]. Помимо этого избегающие инактивации гены были обнаружены у мыши и некоторых других плацентарных млекопитающих [58, 59]. Однако причины, по которым те или иные гены X-хромосомы избегают инактивации, на сегодняшний день так и не установлены. В ряде случаев избегание инактивации можно объяснить наличием у генов X-хромосомы гомологов на Y-хромосоме. В этом случае избегание инактивации позволяет восстановить равный уровень экспрессии генов между полами. Тем не менее многие избегающие инактивации гены не имеют Y-гомологов. Возможно, что более высокий уровень экспрессии этих генов у самок связан с формированием специфичных для женского пола признаков [60, 61]. Интересно, что уровень экспрессии многих избегающих инактивации генов на неактивной X-хромосоме значительно ниже, чем на активной X-хромосоме [8, 9, 57]. Это предполагает, что более высокий уровень экспрессии данных генов у самок может и не играть какой-либо существенной роли. Не исключено также, что дисбаланс генов X-хромосомы может устраняться уже после транскрипции [60, 61].

Было высказано предположение, что для эффективного распространения неактивного состояния на X-хромосоме должны существовать вспомогательные элементы. Наиболее вероятными кандидатами на роль таких элементов считают LINE-элементы [62]. В пользу этого предположения свидетельствует то, что X-хромосомы человека и мыши имеют двукратное обогащение LINE-элементами по сравнению с аутосомами. Стоит отметить также и то, что распределение LINE-элементов на X-хромосоме человека коррелирует со статусом экспрессии генов. Наибольшая плотность LINE-элементов выявляется в центре инактивации и районах генов, подвергающихся инактивации. В районах, обогащенных избегающими инактивации генами, плотность LINE-элементов, напротив, снижена [57, 63, 64]. Однако, какие именно последовательности нужны для эффективного распространения неактивного состояния вдоль X-хромосомы и каковы механизмы действия этих последовательностей, на данный момент неизвестно.

ОБЩИЕ СВОЙСТВА ДОЗОВОЙ КОМПЕНСАЦИИ ГЕНОВ X-ХРОМОСОМЫ

Исследования трех модельных объектов (*D. melanogaster*, *C. elegans* и млекопитающих) показывают, что дозовая компенсация генов X-хромосомы может осуществляться с помощью различных механизмов. Различия в способах дозовой компенсации, по-видимому, являются отражением независимого происхождения половых хромосом данных видов и, как следствие, независимого возникновения механизмов, направленных на регуляцию экспрессии генов X-хромосомы. Несмотря на отличия, в способах дозовой компенсации генов X-хромосомы у *D. melanogaster*, *C. elegans* и млекопитающих можно выделить несколько общих черт. Во-первых, дозовая компенсация достигается за счет механизмов, действующих на хромосомном уровне, причем эти механизмы не возникают *de novo*, для регуляции уровня экспрессии генов X-хромосомы адаптируются уже существующие белки и белковые комплексы. Во-вторых, общим для всех трех систем дозовой компенсации является удвоение уровня экспрессии генов на единственной X-хромосоме самцов, хотя механизмы, лежащие в основе этого феномена, могут отличаться. В-третьих, необходимый уровень экспрессии генов обеспечивается посредством изменения структуры хроматина X-хромосомы с помощью модифицирующих хроматин комплексов. У *D. melanogaster* и млекопитающих действие модифицирующих хроматин комплексов в процессе дозовой компенсации генов X-хромосомы связано с экспрессией некодирующих РНК. Тесная связь

между некодирующими РНК и регуляцией экспрессии генов предполагает, что некодирующая РНК со временем может быть найдена и в системе дозовой компенсации *C. elegans*. В-четвертых, X-хромосома содержит набор последовательностей, которые отвечают за связывание и эффективное распространение комплексов, участвующих в дозовой компенсации генов. Таким образом, механизмы дозовой компенсации позволяют достигать равного уровня экспрессии генов X-хромосомы и аутосом у обоих полов, а также равного уровня экспрессии генов X-хромосомы между полами. Транскрипционный баланс генов X-хромосомы поддерживается в различных типах соматических тканей и герминальных клетках у обоих полов *D. melanogaster* и млекопитающих [7, 8], что свидетельствует о его несомненной важности для организма.

ДОЗОВАЯ КОМПЕНСАЦИЯ ГЕНОВ Z-ХРОМОСОМЫ У ПТИЦ И БАБОЧЕК

По аналогии с системой половых хромосом XY следовало бы ожидать, что и в системе половых хромосом ZW должно происходить удвоение уровня экспрессии генов у гетерогаметного пола (самок) на единственной Z-хромосоме. Однако первые исследования экспрессии небольшого количества генов Z-хромосомы у птиц и бабочек показали, что часть генов экспрессировалась на более высоком уровне у самцов по сравнению с самками [65–68]. Так что существование дозовой компенсации генов Z-хромосомы долгое время было под сомнением.

Использование метода микрочипов позволило измерить уровень экспрессии генов Z-хромосомы и аутосом у двух видов птиц (курицы и зебровой амадины) и тутового шелкопряда. Оказалось, что значения соотношений уровней экспрессии генов Z-хромосомы между самцами и самками птиц варьировали между 1 и 2, т.е. создается впечатление, что по уровню экспрессии генов Z-хромосома занимает промежуточное положение между дозовой компенсацией на хромосомном уровне и полным отсутствием дозовой компенсации [69, 70]. Аналогичная ситуация была обнаружена и при изучении экспрессии генов Z-хромосомы у тутового шелкопряда [71]. Более того, у зебровой амадины гены Z-хромосомы четко разделялись на две группы: часть генов экспрессировалась на одинаковых уровнях у обоих полов, в то время как остальные гены экспрессировались на более высоком уровне у самцов [69]. По всей видимости, у птиц и бабочек нет механизмов, которые регулировали бы экспрессию генов всей Z-хромосомы, но тем не менее часть генов Z-хромосомы самок подвергается дозовой компенсации (рис. 3). Механизмы этого явления пока еще

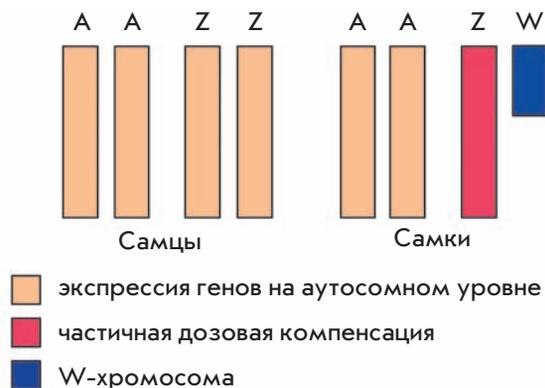


Рис. 3. Дозовая компенсация генов Z-хромосомы у птиц и бабочек. А – набор аутосом, Z и W – половые хромосомы.

не установлены. Однако было показано, что у птиц на Z-хромосоме существует особый локус – МНМ (male hypermethylated). Этот локус гиперметилирован у самцов, а у самок с него транскрибируется некодирующая РНК, которая накапливается в окружающем МНМ районе. У самок данный район ацетиленован по лизину в 16-м положении гистона H4 (H4K16). Кроме того, было обнаружено, что хотя гены, подвергающиеся дозовой компенсации, распределены вдоль всей Z-хромосомы, большая их часть сосредоточена именно возле локуса МНМ. Возможно, что у птиц дозовая компенсация генов Z-хромосомы осуществляется по тому же принципу, что и у *D. melanogaster*: некодирующая РНК и ацетилирование H4K16 обеспечивают повышенный уровень экспрессии генов Z-хромосомы у самок [72].

Разница в степени дозовой компенсации между X- и Z-хромосомами могла бы объясняться их возрастом. В случае молодых половых хромосом механизмы, которые регулировали бы экспрессию генов на хромосомном уровне, могли просто еще не успеть сформироваться. Было установлено, что половые хромосомы птиц (не менее 150 млн лет) очень близки по возрасту к половым хромосомам млекопитающих (не менее 166 млн лет). В то же время половые хромосомы *D. melanogaster* являются относительно молодыми (~65 млн лет), но этого срока оказалось достаточно для формирования хромосомного механизма дозовой компенсации. Следовательно, возраст половых хромосом не влияет на степень дозовой компенсации [22, 73]. Известно, что гемизиготность по нескольким генам или небольшим районам генома может и не иметь каких-либо последствий для организма. Z-хромосомы птиц и бабочек содержат порядка 840 и 600 генов соответственно, что заметно меньше, чем

на X-хромосомах *D. melanogaster*, *C. elegans* и человека (2300, 3100 и 1100 генов). Возможно, что именно меньшее число генов на половых хромосомах позволяет птицам и бабочкам обходиться без хромосомных механизмов дозовой компенсации. Однако гемизиготность по нескольким сотням генов все равно должна приводить к летальному исходу, а значит, ограниченная дозовая компенсация у птиц и бабочек не может быть результатом более низкой плотности генов на половых хромосомах [22, 73]. Пока очевидно лишь то, что локальная дозовая компенсация обнаружена у организмов, у которых гетерогаметным полом являются самки (ZW). Поскольку был проанализирован уровень экспрессии генов Z-хромосомы только у представителей двух таксонов, то остается неясным, является ли такой способ дозовой компенсации особенностью организмов с системой половых хромосом ZW или это просто случайное совпадение. Ответить на этот вопрос, вероятно, поможет изучение других таксонов с гетерогаметностью у самок [22, 73].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данные по экспрессии генов половых хромосом у птиц и бабочек заставляют нас по-новому взглянуть на проблему дозовой компенсации генов. Становится очевидным, что гены половых хромосом в разной степени подвержены действию системы дозовой компенсации (вплоть до полного избегания дозовой компенсации). Похоже, что механизмы дозовой компенсации возникали в ходе эволюции для регуляции уровня экспрессии лишь определенного набора генов, а не целой половой хромосомы. Это предположение, по-видимому, справедливо не только для Z-хромосомы, но и для X-хромосомы. Об этом свидетельствует наличие избегающих дозовой компенсации генов у млекопитающих и *D. melanogaster*. Дальнейшие исследования, вероятно, будут направлены на то, чтобы понять, какие гены половых хромосом действительно нуждаются в дозовой компенсации, а также каким образом определяется степень дозовой компенсации индивидуальных генов половых хромосом. Еще одним важным направлением в исследовании дозовой компенсации генов половых хромосом может стать установление механизмов, лежащих в основе удвоения уровня экспрессии генов на X-хромосомах самцов и самок (гермафродитов) у *C. elegans* и млекопитающих. Ответить на все эти вопросы должно помочь изучение гетероморфных половых хромосом в новых таксонах. ●

Работа поддержана Программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bridges C.B. // *Am. Nat.* 1925. V. 59. P. 127–137.
2. Koopman P., Gubbay J., Vivian N., Goodfellow P., Lovell-Badge R. // *Nature*. 1991. V. 351. P. 117–121.
3. Charlesworth B. // *Science*. 1991. V. 251. P. 1030–1033.
4. Charlesworth B. // *Curr. Biol.* 1996. V. 6. P. 149–162.
5. Dementyeva E.V., Shevchenko A.I., Zakian S.M. // *Bioessays*. 2009. V. 31. P. 21–28.
6. Akhtar A. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2003. V. 13. P. 161–169.
7. Gupta V., Parisi M., Sturgill D., Nuttall R., Doctolero M., Dudko O.K., Malley J.D., Eastman P.S., Oliver B. // *J. Biol.* 2006. V. 5. P. 3.
8. Nguyen D.K., Disteche C.M. // *Nat. Genet.* 2006. V. 38. P. 47–53.
9. Johnston C.M., Lovell F.L., Leongamornlert D.A., Stranger B.E., Dermitzakis E.T., Ross M.T. // *PLoS Genet.* 2008. V. 4. e9.
10. Straub T., Becker P.B. // *Nat. Rev. Genet.* 2007. V. 8. P. 47–57.
11. Akhtar A., Becker P.B. // *Mol. Cell.* 2000. V. 5. P. 367–375.
12. Lucchesi J.C., Kelly W.G., Panning B. // *Annu. Rev. Genet.* 2005. V. 39. P. 615–651.
13. Kind J., Vaquerizas J.M., Gebhardt P., Gentzel M., Luscombe N.M., Bertone P., Akhtar A. // *Cell*. 2008. V. 133. P. 813–828.
14. Prestel M., Feller C., Straub T., Mitlohner H., Becker P.B. // *Mol. Cell.* 2010. V. 38. P. 815–826.
15. Raja S.J., Charapitsa I., Conrad T., Vaquerizas J.M., Gebhardt P., Holz H., Kadlec J., Fraterman S., Luscombe N.M., Akhtar A. // *Mol. Cell.* 2010. V. 38. P. 827–841.
16. Taipale M., Rea S., Richter K., Vilar A., Lichter P., Imhof A., Akhtar A. // *Mol. Cell Biol.* 2005. V. 25. P. 6798–6810.
17. Cai Y., Jin J., Swanson S.K., Cole M.D., Choi S.H., Florens L., Washburn M.P., Conaway J.W., Conaway R.C. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. P. 4268–4272.
18. Lerach S., Zhang W., Deng H., Bao X., Girton J., Johansen J., Johansen K.M. // *Genesis*. 2005. V. 43. P. 213–215.
19. Ebert A., Schotta G., Lein S., Kubicek S., Krauss V., Jenuwein T., Reuter G. // *Genes Dev.* 2004. V. 18. P. 2973–2983.
20. Park Y., Kuroda M.I. // *Science*. 2001. V. 293. P. 1083–1085.
21. Li F., Schiemann A.H., Scott M.J. // *Mol. Cell Biol.* 2008. V. 28. P. 1252–1264.
22. Vicoso B., Bachtrog D. // *Chromosome Res.* 2009. V. 17. P. 585–602.
23. Alekseyenko A.A., Peng S., Larschan E., Gorchakov A.A., Lee O.K., Kharchenko P., McGrath S.D., Wang C.I., Mardis E.R., Park P.J., Kuroda M.I. // *Cell*. 2008. V. 134. P. 599–609.
24. Larschan E., Alekseyenko A.A., Gorchakov A.A., Peng S., Li B., Yang P., Workman J.L., Park P.J., Kuroda M.I. // *Mol. Cell.* 2007. V. 28. P. 121–133.
25. Hamada F.N., Park P.J., Gordadze P.R., Kuroda M.I. // *Genes Dev.* 2005. V. 19. P. 2289–2294.
26. Gilfillan G.D., Straub T., de Wit E., Greil F., Lamm R., van Steensel B., Becker P.B. // *Genes Dev.* 2006. V. 20. P. 858–870.
27. Legube G., McWeeney S.K., Lercher M.J., Akhtar A. // *Genes Dev.* 2006. V. 20. P. 871–883.
28. Heard E., Disteche C.M. // *Genes Dev.* 2006. V. 20. P. 1848–1867.
29. Hellman A., Chess A. // *Science*. 2007. V. 315. P. 1141–1143.
30. Meyer B.J., McDonel P., Csankovszki G., Ralston E. // *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 2004. V. 69. P. 71–79.
31. Chan R.C., Severson A.F., Meyer B.J. // *J. Cell Biol.* 2004. V. 167. P. 613–625.
32. Chuang P.T., Albertson D.G., Meyer B.J. // *Cell*. 1994. V. 79. P. 459–474.
33. Lieb J.D., Capowski E.E., Meneely P., Meyer B.J. // *Science*. 1996. V. 274. P. 1732–1736.
34. Lieb J.D., Albrecht M.R., Chuang P.T., Meyer B.J. // *Cell*. 1998. V. 92. P. 265–277.
35. Tsai C.J., Mets D.G., Albrecht M.R., Nix P., Chan A., Meyer B.J. // *Genes Dev.* 2008. V. 22. P. 194–211.
36. Nagy P.L., Griesenbeck J., Kornberg R.D., Cleary M.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. V. 99. P. 90–94.
37. Meyer B.J. // *WormBook*. 2005. P. 1–14.
38. Dawes H.E., Berlin D.S., Lapidus D.M., Nusbaum C., Davis T.L., Meyer B.J. // *Science*. 1999. V. 284. P. 1800–1804.
39. Chuang P.T., Lieb J.D., Meyer B.J. // *Science*. 1996. V. 274. P. 1736–1739.
40. Davis T.L., Meyer B.J. // *Development*. 1997. V. 124. P. 1019–1031.
41. Yonker S.A., Meyer B.J. // *Development*. 2003. V. 130. P. 6519–6532.
42. Jans J., Gladden J.M., Ralston E.J., Pickle C.S., Michel A.H., Pferdehirt R.R., Eisen M.B., Meyer B.J. // *Genes Dev.* 2009. V. 23. P. 602–618.
43. Lyon M.F. // *Nature*. 1961. V. 190. P. 372–373.
44. Heard E. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2005. V. 15. P. 482–489.
45. Shevchenko A.I., Pavlova S.V., Dement'eva E.V., Golubeva D.V., Zakian S.M. // *Genetika*. 2006. V. 42. P. 1225–1234.
46. Wutz A., Gribnau J. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2007. V. 17. P. 387–393.
47. de Napoles M., Mermoud J.E., Wakao R., Tang Y.A., Endoh M., Appanah R., Nesterova T.B., Silva J., Otte A.P., Vidal M., Koseki H., Brockdorff N. // *Dev. Cell*. 2004. V. 7. P. 663–676.
48. Fang J., Chen T., Chadwick B., Li E., Zhang Y. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 52812–52815.
49. Silva J., Mak W., Zvetkova I., Appanah R., Nesterova T.B., Webster Z., Peters A.H., Jenuwein T., Otte A.P., Brockdorff N. // *Dev. Cell*. 2003. V. 4. P. 481–495.
50. Cao R., Zhang Y. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2004. V. 14. P. 155–164.
51. Ohhata T., Tachibana M., Tada M., Tada T., Sasaki H., Shinkai Y., Sado T. // *Genesis*. 2004. V. 40. P. 151–156.
52. Nishioka K., Rice J.C., Sarma K., Erdjument-Bromage H., Werner J., Wang Y., Chuikov S., Valenzuela P., Tempst P., Steward R., Lis J.T., Allis C.D., Reinberg D. // *Mol. Cell*. 2002. V. 9. P. 1201–1213.
53. Duret L., Chureau C., Samain S., Weissenbach J., Avner P. // *Science*. 2006. V. 312. P. 1653–1655.
54. Elisaphenko E.A., Kolesnikov N.N., Shevchenko A.I., Rogozin I.B., Nesterova T.B., Brockdorff N., Zakian S.M. // *PLoS ONE*. 2008. V. 3. e2521.
55. Reik W., Lewis A. // *Nat. Rev. Genet.* 2005. V. 6. P. 403–410.
56. Zakharova I.S., Shevchenko A.I., Zakian S.M. // *Chromosoma*. 2009. V. 118. P. 279–290.
57. Carrel L., Willard H.F. // *Nature*. 2005. V. 434. P. 400–404.
58. Disteche C.M., Filippova G.N., Tsuchiya K.D. // *Cytogenet. Genome Res.* 2002. V. 99. P. 36–43.
59. Yen Z.C., Meyer I.M., Karalic S., Brown C.J. // *Genomics*. 2007. V. 90. P. 453–463.
60. Disteche C.M. // *Trends Genet.* 1995. V. 11. P. 17–22.
61. Brown C.J., Greally J.M. // *Trends Genet.* 2003. V. 19. P. 432–438.
62. Lyon M.F. // *Cytogenet. Cell Genet.* 1998. V. 80. P. 133–137.
63. Bailey J.A., Carrel L., Chakravarti A., Eichler E.E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. P. 6634–6639.
64. Ross M.T., Grafham D.V., Coffey A.J., Scherer S., McLay K., Muzny D., Platzer M., Howell G.R., Burrows J., Bird C.P., Frankish A., Lovell F.L., Howe K.L., Ashurst J.L., Fulton R.S., Sudbrak R., Wen G., Jones M.C., Hurler M.E., Andrews T.D., Scott C.E., Searle S., Ramser J., Whittaker A., Deadman R.,

- Carter N.P., Hunt S.E., Chen R., Cree A., Gunaratne P., Havlak P., Hodgson A., Metzker M.L., Richards S., Scott G., Steffen D., Sodergren E., Wheeler D.A., Worley K.C., Ainscough R., Ambrose K.D., Ansari-Lari M.A., Aradhya S., Ashwell R.I., Babbage A.K., Bagguley C.L., Ballabio A., Banerjee R., Barker G.E., Barlow K.F., Barrett I.P., Bates K.N., Beare D.M., Beasley H., Beasley O., Beck A., Bethel G., Blechschmidt K., Brady N., Bray-Allen S., Bridgeman A.M., Brown A.J., Brown M.J., Bonnin D., Bruford E.A., Buhay C., Burch P., Burford D., Burgess J., Burrill W., Burton J., Bye J.M., Carder C., Carrel L., Chako J., Chapman J.C., Chavez D., Chen E., Chen G., Chen Y., Chen Z., Chinault C., Ciccodicola A., Clark S.Y., Clarke G., Clee C.M., Clegg S., Clerc-Blankenburg K., Clifford K., Cobley V., Cole C.G., Conquer J.S., Corby N., Connor R.E., David R., Davies J., Davis C., Davis J., Delgado O., Deshazo D., Dhami P., Ding Y., Dinh H., Dodsworth S., Draper H., Dugan-Rocha S., Dunham A., Dunn M., Durbin K.J., Dutta I., Eades T., Ellwood M., Emery-Cohen A., Errington H., Evans K.L., Faulkner L., Francis F., Frankland J., Fraser A.E., Galgoczy P., Gilbert J., Gill R., Glockner G., Gregory S.G., Gribble S., Griffiths C., Grocock R., Gu Y., Gwilliam R., Hamilton C., Hart E.A., Hawes A., Heath P.D., Heitmann K., Hennig S., Hernandez J., Hinzmann B., Ho S., Hoffs M., Howden P.J., Huckle E.J., Hume J., Hunt P.J., Hunt A.R., Isherwood J., Jacob L., Johnson D., Jones S., de Jong P.J., Joseph S.S., Keenan S., Kelly S., Kershaw J.K., Khan Z., Kioschis P., Klages S., Knights A.J., Kosiura A., Kovar-Smith C., Laird G.K., Langford C., Lawlor S., Leversha M., Lewis L., Liu W., Lloyd C., Lloyd D.M., Loulseged H., Loveland J.E., Lovell J.D., Lozado R., Lu J., Lyne R., Ma J., Maheshwari M., Matthews L.H., McDowall J., McLaren S., McMurray A., Meidl P., Meitinger T., Milne S., Miner G., Mistry S.L., Morgan M., Morris S., Muller I., Mullikin J.C., Nguyen N., Nordsiek G., Nyakatura G., O'Dell C.N., Okwuonu G., Palmer S., Pandian R., Parker D., Parrish J., Pasternak S., Patel D., Pearce A.V., Pearson D.M., Pelan S.E., Perez L., Porter K.M., Ramsey Y., Reichwald K., Rhodes S., Ridler K.A., Schlessinger D., Schueler M.G., Sehra H.K., Shaw-Smith C., Shen H., Sheridan E.M., Shownkeen R., Skuce C.D., Smith M.L., Sotheran E.C., Steingruber H.E., Steward C.A., Storey R., Swann R.M., Swarbreck D., Tabor P.E., Taudien S., Taylor T., Teague B., Thomas K., Thorpe A., Timms K., Tracey A., Trevanion S., Tromans A.C., d'Urso M., Verduzco D., Villasana D., Waldron L., Wall M., Wang Q., Warren J., Warry G.L., Wei X., West A., Whitehead S.L., Whiteley M.N., Wilkinson J.E., Willey D.L., Williams G., Williams L., Williamson A., Williamson H., Wilming L., Woodmansey R.L., Wray P.W., Yen J., Zhang J., Zhou J., Zoghbi H., Zorilla S., Buck D., Reinhardt R., Poustka A., Rosenthal A., Lehrach H., Meindl A., Minx P.J., Hillier L.W., Willard H.F., Wilson R.K., Waterston R.H., Rice C.M., Vaudin M., Coulson A., Nelson D.L., Weinstock G., Sulston J.E., Durbin R., Hubbard T., Gibbs R.A., Beck S., Rogers J., Bentley D.R. // *Nature*. 2005. V. 434. P. 325–337.
65. Baverstock P.R., Adams M., Polkinghorne R.W., Gelder M. // *Nature*. 1982. V. 296. P. 763–766.
66. McQueen H.A., McBride D., Miele G., Bird A.P., Clinton M. // *Curr. Biol*. 2001. V. 11. P. 253–257.
67. Suzuki M.G., Shimada T., Kobayashi M. // *Heredity*. 1998. V. 81. P. 275–283.
68. Suzuki M.G., Shimada T., Kobayashi M. // *Heredity*. 1999. V. 82. P. 170–179.
69. Itoh Y., Melamed E., Yang X., Kampf K., Wang S., Yehya N., van Nas A., Replogle K., Band M.R., Clayton D.F., Schadt E.E., Lusis A.J., Arnold A.P. // *J. Biol*. 2007. V. 6. P. 2.
70. Ellegren H., Hultin-Rosenberg L., Brunstrom B., Dencker L., Kultima K., Scholz B. // *BMC Biol*. 2007. V. 5. P. 40.
71. Zha X., Xia Q., Duan J., Wang C., He N., Xiang Z. // *Insect Biochem. Mol. Biol*. 2009. V. 39. P. 315–321.
72. Melamed E., Arnold A.P. // *Genome Biol*. 2007. V. 8. P. R202.
73. Mank J.E. // *Trends Genet*. 2009. V. 25. P. 226–233.

УДК 577.24

Роль *p66shc* в окислительном стрессе и апоптозе

Е. Р. Галимов

Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, МГУ

E-mail: e.r.galimov@gmail.com

Поступила в редакцию 03.11.2010 г.

РЕФЕРАТ *p66shc* – ген-регулятор продолжительности жизни млекопитающих, который влияет на содержание активных форм кислорода (АФК) в клетке и развитие апоптоза. У мышей с нокаутом гена *p66shc* продолжительность жизни на 30% больше, чем у мышей дикого типа, они устойчивы к действию окислительного стресса и развитию патологических состояний, связанных со старением, – гиперхолестеринемии, ишемии и гипергликемии. В связи с этим, *p66shc* рассматривается в качестве перспективной мишени для лекарственной терапии многих возрастных заболеваний. В представленном обзоре обобщены, систематизированы и критически рассмотрены данные об участии *p66shc* в сигнальных путях, регулирующих окислительный стресс и апоптоз.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА апоптоз, активные формы кислорода, *p66shc*, митохондрии.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АФК – активные формы кислорода; ДМТМ – диметилтиомочевина; ММП – межмембранное пространство митохондрий; ТМФД – N,N,N',N'-тетраметил-*n*-фенилендиамин; Akt – протеинкиназа В; Cdc42 (от англ. cell division control protein 42 homolog) – малая GTP-аза подсемейства Rho-GTP-аз; Cyt C – цитохром с; Grb2 – белок, связывающий рецепторы ростовых факторов; ERK – киназы, регулируемые внеклеточными сигналами; HIV-1 – вирус иммунодефицита человека 1; JNK – N-концевая протеинкиназа с-Jun; MAPK – протеинкиназы, активируемые митогенами; mHSP70 – митохондриальный белок теплового шока 70 кДа; MnSOD – митохондриальная супероксиддисмутаза; Rac-1 – Ras-подобный субстрат 1 ботулотоксина С3; RAS – онкоген вируса саркомы крыс; SOS1 (от англ. Son of Sevenless) – фактор обмена нуклеотидов; PKC β – протеинкиназа С β ; Pin-1 – пептидилпролил-*цис*/транс-изомераза; PP2A – протеинфосфатаза 2; Prx1 – пероксиредоксин 1; PTP-PEST – специфичная для фосфотирозин фосфатаза с C-концевой последовательностью PEST, REF-1 – редокс-фактор-1; TIM – транслоказа внутренней мембраны митохондрий; TOM – транслоказа белков-предшественников внешней мембраны митохондрий.

ВВЕДЕНИЕ

Идентификация множества мутаций, продлевающих жизнь разных модельных организмов, свидетельствует о том, что старение можно рассматривать как генетическую программу [1]. Один из таких генов – *p66shc*, делеция которого увеличивает продолжительность жизни мышей на 30%. Важно отметить, что мыши с нокаутом гена *p66shc*, в отличие от других мышинных моделей с увеличенной продолжительностью жизни (например, мышей с делецией гена рецептора гормона роста), фертильны и имеют нормальный фенотип [2]. Эти мыши устойчивы к действию окислительного стресса и к развитию связанных с ним патологий, таких, как атеросклероз [3], нарушение функций эндотелия [4], AGE (от англ. advanced glycation end products)–зависимая гломерулопатия при сахарном диабете [5, 6] и индуцированное этанолом поражение печени [7].

Белок P66shc относится к семейству адапторных белков shc, кодируемых одним локусом у *Drosophila* (*dShc*) и четырьмя локусами у млекопитающих – *Shc* (*ShcA*), *Sli* (*ShcB*), *Rai* (*ShcC*) [8] и *RalP* [9]. Четыре локуса млекопитающих кодируют по крайней мере семь белков, которые образуются благодаря использованию альтернативных инициаторных кодонов и альтернативному сплайсингу. Три изоформы, кодируемые локусом *ShcA*, обозначают по их молекулярной массе – p46shc, p52shc и p66shc соответственно. Эти белки участвуют как в регуляции пролиферации (p46shc и p52shc), так и апоптоза (p66shc) [8].

P66shc является относительно «молодым» белком: он не обнаружен у дрожжей (*Saccharomyces*), нематод (*Caenorhabditis*) и насекомых (*Drosophila*), но появляется у земноводных (*Xenopus*), рыб (*Fugu rubripes*) и млекопитающих [8]. Как самая длинная изоформа, p66shc содержит все эволюционно более

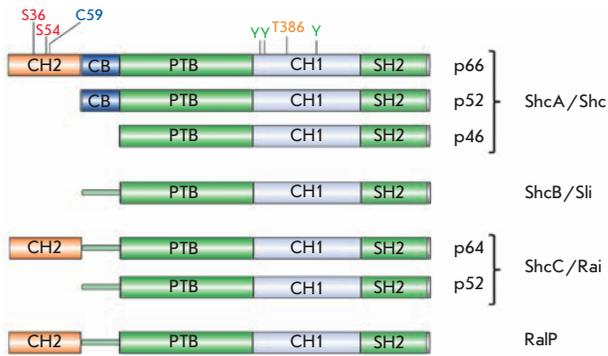


Рис. 1. Схематическое представление доменной структуры SHC-подобных белков. На схеме обозначены модифицируемые аминокислотные остатки: серины 36 и 54 (S36 и S54), цистеин 59 (C59), треонин 386 (T386) и тирозины (Y), фосфорилируемые в процессе передачи сигнала от тирозинкиназных рецепторов.

древние домены, найденные в коротких изоформах p46shc и p52shc (см. рис. 1): N-концевой фосфотирозинсвязывающий домен (PTV), центральный участок, гомологичный коллагену (CH1), и C-концевой домен, гомологичный Src (SH2). Изоформы, более длинные, чем p46shc, содержат дополнительные N-концевые домены: цитохром-с-связывающий домен (CB), общий для p52shc и p66shc, но уникальный для p66 домен, гомологичный коллагену (CH2).

P46shc и p52shc функционируют в качестве адапторных белков, передавая сигнал от различных тирозинкиназных рецепторов, которые фосфорилируют остатки тирозина в CH1-домене этих белков. Фосфорилирование p46shc/p52shc стимулирует образование комплекса GRb2 (адапторный белок) и SOS (фактор обмена нуклеотидов), что ведет к активации белка RAS и к запуску каскада митоген-активируемых протеинкиназ (MAPK). Хотя p66shc, как и p46shc/p52shc, фосфорилируется тирозинкиназными рецепторами и взаимодействует с комплексом GRb2/SOS, он, по-видимому, не активирует MAPK [10]. Конкуренция p66shc и p52shc за связывание с GRb2 [11] и индуцированное p66shc вытеснение SOS из комплекса с GRb2 [12, 13] могут участвовать в регуляции путей передачи сигнала от рецепторов. Однако эксперименты на модельных объектах с генетическим нокаутом *p66shc* показали, что роль этого белка в регуляции продолжительности жизни, окислительном стрессе и апоптозе связана с доменами CH2 и CB, ненужными для первоначальной адапторной функции белка.

Р66, ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС И АПОПТОЗ

Изучение мышей с нокаутом гена *p66shc* показало, что у них снижено содержание вну-

триклеточных АФК, определяемое с помощью АФК-чувствительных зондов, а также уровень окислительного повреждения ДНК и белков, оцениваемый по количеству 8-оксо-дезоксигуанозина и нитротирозин [3, 4, 14–16]. Мутантные мыши характеризовались повышенной устойчивостью к окислительному стрессу, вызванному паракватом [2]. Изучение различных культур клеток мыши, крысы и человека с инактивированным p66 (либо с помощью делеции, либо введением доминантно негативного мутанта с заменой серина 36 (S36) на аланин) показало, что p66shc необходим для развития апоптоза, вызванного различными индукторами (см. табл. 1). Предполагается, что для апоптоза в этих моделях критическим является окислительный стресс, опосредованный p66shc. В частности, опубликованы данные в пользу того, что окислительный стресс, вызванный p66shc, необходим для развития p53-зависимого апоптоза [14]. Подобные выводы можно сделать и исходя из данных, полученных в ходе физиологических экспериментов (см. табл. 2).

В активации проапоптотической функции p66shc важную роль играют посттрансляционные модификации. Так показано, что фосфорилирование S36, расположенного в CH2-домене, необходимо для развития апоптоза, вызванного перекисью водорода и ультрафиолетовым излучением [2]. Сама реакция фосфорилирования может осуществляться различными киназами, такими, как JNK в ответ на ультрафиолетовое излучение или амилоидный β-пептид [23, 33], ERK [34], и PKCβ в ответ на обработку перекисью [35]. Фосфорилирование S36 ведет к взаимодействию с белками 14-3-3 [36], тирозиновой фосфатазой PTP-PEST [37] и пролизомеразой Pin-1 [35]. Если роль первых двух взаимодействий в апоптозе пока неясна, то Pin-1-зависимая изомеризация p66shc играет важную роль в регуляции его транспорта в митохондрию и в активации апоптоза, зависящего от митохондрий (см. ниже).

Однако, помимо большого количества работ, свидетельствующих о проапоптотической функции p66shc, имеются данные о том, что p66shc может защищать от апоптоза. На модели рака молочной железы, а также на стволовых клетках человека показано, что подавление экспрессии *p66shc* защищает от цитотоксического действия гипоксии. Выяснилось также, что низкое содержание кислорода приводит к активации p66shc, что, в свою очередь, способствует экспрессии гена *Notch-3*, ответственного за самообновление стволовых клеток и их выживание в условиях гипоксии. *Notch-3* способствует экспрессии гена карбоангидразы IX, также связанного с фенотипом, устойчивым к гипоксии [38]. Таким образом, открыта регуляторная связь между p66shc и путем, защи-

Таблица 1. Клеточные модели, инактивация *p66shc* (с помощью делеции гена *p66shc* или введения доминантно негативного мутанта по S36) в которых вызывает устойчивость к апоптозу

Клетки	Клеточная линия	Организм	Индуктор апоптоза	Ссылка
Эмбриональные фибробласты	MEF	Мышь	H ₂ O ₂ , ультрафиолетовое излучение, стауропорин, изотиоцианат, хлороформ	[2, 15, 17, 18]
Первичные кардиомиоциты		»	Ангиотензин II	[19]
Трансформированный почечный эпителий	TKPTS	»	H ₂ O ₂ , цисплатин	[13]
Клетки печени, трансгенные по TGF α человека	AML12	»	Гипоксия-реоксигенация	[20]
Предшественники эндотелиальных клеток	BM c-kit+	»	Высокое содержание глюкозы в среде	[21]
Остеобластные клетки	OB-6, UAMS-32	»	H ₂ O ₂	[22]
Феохромоцитома крысы	PC12	Крыса	Амилоидный β -пептид, конститутивно активная форма Rac-1	[23]
Зрелые кардиомиоциты из желудочка сердца	ARVM	»	Высокое содержание глюкозы в среде	[24]
Трансформированные фибробластоподобные клетки	COS7	Зеленая мартышка	Конститутивно активная форма Rac-1	[25]
Нейробластома человека	SH-SY5Y	Человек	Амилоидный β -пептид	[23]
Иммортализованные Т-антигеном подоциты человека	CIDHPs	»	Трансфекция HIV-1	[26]
Рак предстательной железы	PC3, LNCaP	»	Изотиоцианат	[18]
Рак шейки матки	HeLa	»	H ₂ O ₂	[27]
Остеосаркома	SaOs-2	»	H ₂ O ₂	[27]
Пигментный эпителий сетчатки человека	RPE	»	H ₂ O ₂	[28]
Лимфома	Jurcat	»	Гипоксия, ионофоры кальция	[29]
Трансформированный почечный эпителий	фNx-293	»	Открепление от подложки	[30]
Эндотелиальные клетки	HuVec	»	Открепление от подложки	[30]

щающим стволовые клетки от гипоксии. Эти данные проясняют роль *p66* в гомеостазе и самообновлении стволовых клеток, которые поддерживаются в специальных тканевых участках, или «нишах», содержащих мало сосудов, а потому имеющих низкое содержание кислорода. Интересно, что малая GTP-аза Rac-1, известный активатор *p66*-зависимого окислительного стресса [25], также играет важную роль в поддержании и самообновлении эпидермальных стволовых клеток. Вместе эти данные свидетельствуют о более сложной роли белка *p66shc*, действующего как «обоюдоострый меч» в регуляции апоптоза в зависимости от внешних условий и генетического контекста.

МЕХАНИЗМЫ P66-ЗАВИСИМОГО ПОВЫШЕНИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА

На данный момент описаны три механизма, с помощью которых *p66shc* может повышать уровень внутриклеточных АФК: активация мембранных

Таблица 2. Участие *p66shc* в развитии патологий, связанных с окислительным стрессом, показанное на физиологических моделях (эксперименты на животных с делецией гена *p66shc* или сравнение молодых и старых особей)

Патология, связанная с апоптозом	Организм и генетическая линия	Ссылка
Экспериментальная диабетическая гломерулопатия	Мышь, линия SV/129	[5]
Апоптоз сосудистого эндотелия и атерогенез при окислительном стрессе, вызванном высокожировой диетой	Мышь, линия SV/129	[3]
Апоптоз кардиомиоцитов в экспериментальной модели стрептозотоцинового диабета	Мышь, линия SV/129	[31]
Гипоксия коры головного мозга	Крыса, линия Sprague-Dawley	[32]

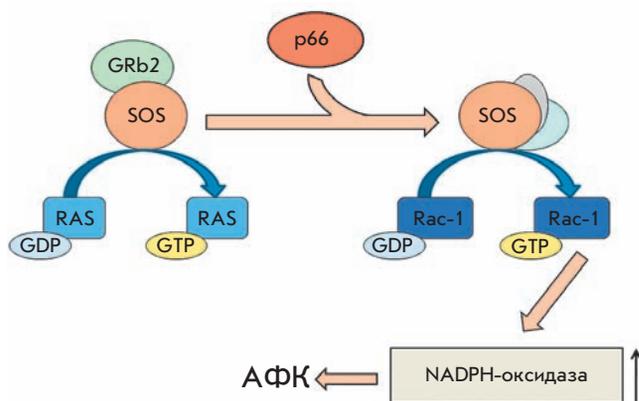


Рис. 2. *r66*-Зависимая активация мембранных NADPH-оксидаз. *r66shc* вытесняет фактор обмена нуклеотидов SOS из комплекса с GRb2 и способствует SOS-зависимой активации малой GTP-азы Rac-1. Активированный Rac-1 стимулирует сборку мембранных NADPH-оксидаз и генерацию АФК.

NADPH-оксидаз, негативная регуляция синтеза антиоксидантных ферментов и генерация АФК в митохондриях.

***r66*-Зависимая активация мембранных NADPH-оксидаз**

В первую очередь отметим, что *r66shc* может вызывать окислительный стресс, действуя согласно своей канонической функции как адапторный белок. Как сказано выше, этот белок может негативно влиять на активацию RAS, вытесняя фактор обмена нуклеотидов SOS из комплекса с GRb2. Оказалось, что при этом *r66* способствует SOS-зависимой активации малой GTP-азы Rac-1, что стимулирует сборку мембранных NADPH-оксидаз и образование АФК [12] (см. рис. 2). Показано, что *r66shc* необходим для апоптоза, индуцированного конститутивно активным мутантом Rac-1. Однако для этого вида апоптоза ключевой посттрансляционной модификацией оказалось фосфорилирование не S36, а S54 и T386, которое ведет к Rac-1-зависимой стабилизации *r66shc* и защите его от убиквитинзависимой деградации [25]. В макрофагах, где NADPH-оксидаза служит основным источником АФК, нокаут гена *r66shc* нарушает образование активного комплекса NADPH-оксидазы, что снижает продукцию АФК на 40% [39].

***r66shc* и регуляция экспрессии антиоксидантных ферментов**

В ряде работ показано, что *r66shc* снижает уровень экспрессии антиоксидантных ферментов и регуляторных факторов: глутатионпероксидазы-1 [28], MnSOD [7, 20, 28], REF-1 [20], в частности за счет не-

гативной регуляции факторов транскрипции типа Forkhead (например, Фохоза) [23, 40, 41]. Во время окислительного стресса серин/треониновая протеинкиназа Akt фосфорилируется и, в свою очередь, фосфорилирует и инактивирует Фохоза. Для этой реакции необходимо присутствие в клетке *r66shc* [40], а также его фосфорилирование по S36 [42]. Кроме того, есть данные, что *r66shc* в комплексе с белком βPix (фактор обмена нуклеотидов для Rac-1 и Cdc42) может приводить к Akt-независимому фосфорилированию и инактивации Фохоза [43] (см. рис. 3).

Этим данным противоречат результаты нескольких работ, согласно которым *r66shc* не влияет на уровень антиоксидантных ферментов [4, 15–17].

***r66shc* и митохондриальный путь развития апоптоза**

Устойчивость клеток с делецией гена *r66shc* к самым различным индукторам апоптоза, в котором участвуют митохондрии, наводит на мысль о том, что *r66* непосредственно взаимодействует с митохондриями.

Митохондриальная локализация *r66shc* и его транспорт в митохондрии. Изучение локализации *r66shc* в клетке показало, что 32% белка находится в цитоплазме, 24% – в эндоплазматическом ретикулуме, а 44% клеточного пула – в митохондриях [17]. Внутри митохондрий *r66* распределен следующим образом: 35% в межмембранном пространстве, 56% ассоциировано с внутренней мембраной и 9% находится в матриксе митохондрий [15]. Согласно другим данным митохондрии содержат лишь 10% *r66shc* [44]. Возможно, эти различия связаны с тем, что локализация *r66shc* меняется при внешних воздействиях на клетку.

К стимулам, приводящим к транслокации *r66shc* в митохондрию, относятся проапоптотические воздействия, такие, как ультрафиолетовое излучение и обработка перекисью водорода [17, 35]. Однако механизм транспорта *r66shc* в митохондрию пока

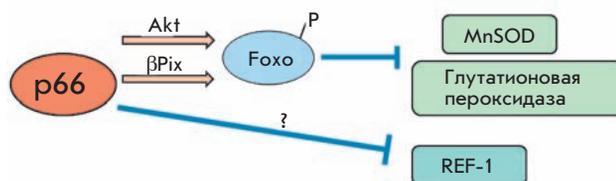


Рис. 3. *r66shc* и регуляция антиоксидантной системы защиты клетки. *r66shc* снижает уровень антиоксидантных ферментов и регуляторных факторов. В этих процессах играет важную роль Akt-зависимая и Akt-независимая инактивация транскрипционных факторов Forkhead.

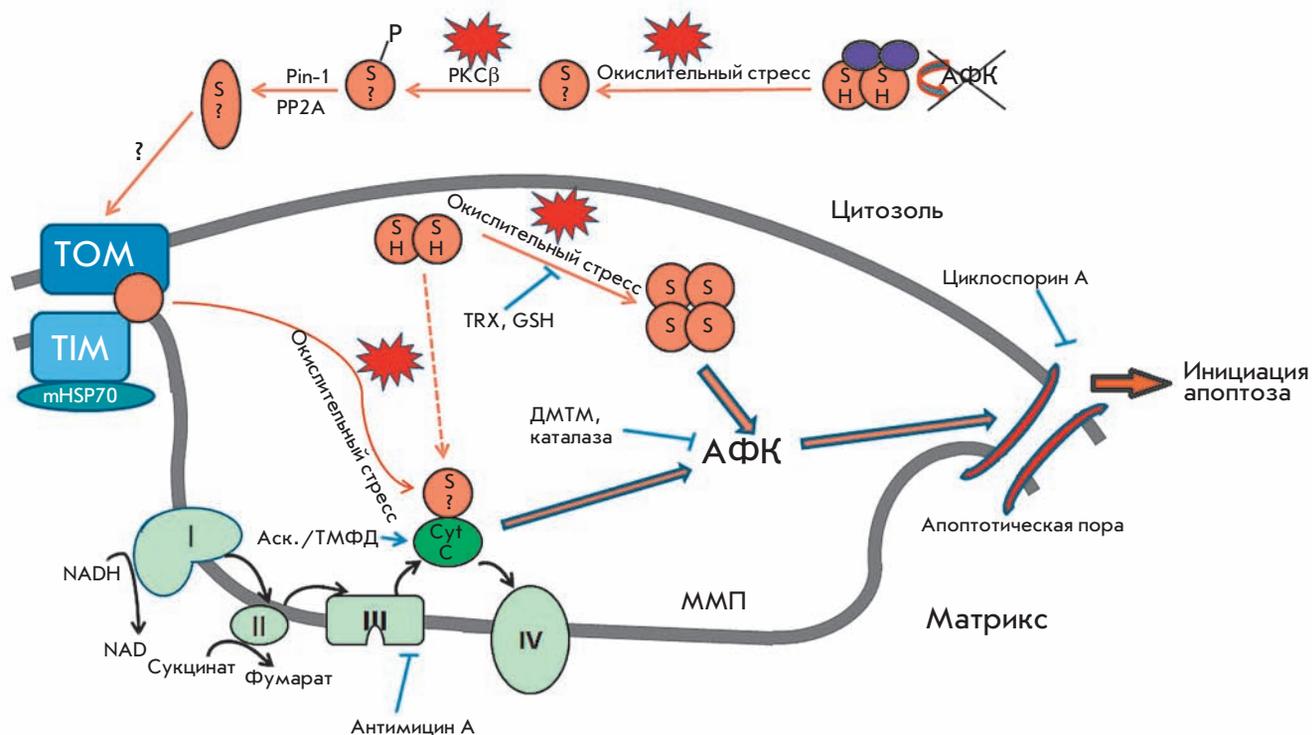


Рис. 4. Модель запуска апоптотического сигнала в митохондриях. p66shc (обозначен оранжевым кружком) может находиться в димерном состоянии (кружки, где SH обозначает восстановленный остаток цистеина 59) и тетрамерном (кружки, где S обозначает окисленный остаток цистеина 59). Если степень окисления цистеина 59, ответственного за тетрамеризацию p66, не известна, то белок обозначен кружком с «S?». В цитозоле при взаимодействии p66shc с пероксиредоксином 1 (Prx1, обозначен фиолетовым овалом) образуется комплекс димерного p66 и димерного Prx1, в котором пероксидазная активность Prx1 инактивирует производимые p66 АФК. При наступлении окислительного стресса комплекс распадается, РКСβ фосфорилирует p66 по серину 36. Фосфорилированный p66shc становится мишенью пролилизомеразы Pin-1, которая узнает пролин, следующий за фосфорилированным остатком серина. После изомеризации p66shc дефосфорилируется фосфатазой PP2A и транспортируется в митохондрии. Во время окислительного стресса p66shc высвобождается из высокомолекулярного комплекса, содержащего субъединицы TOM, TIM и mHSP70, и, действуя, как оксидоредуктаза, переносит электроны с восстановленного Cyt C на кислород. В результате образовавшиеся АФК приводят к формированию апоптотической поры и инициации апоптоза. К этим же последствиям при стрессе и вызванном им недостатке восстановленных тиоредоксина и глутатиона может приводить образование тетрамера p66shc (пояснения в тексте). Аск. – аскорбат, ДМТМ – диметилтиомочевина, ММП – межмембранное пространство митохондрий, TRX – тиоредоксин, GSH – глутатион.

остаётся невыясненным. Известно, что короткая изоформа Shc – p46shc – также локализуется в митохондриях и содержит сигнал импорта в митохондрию [45]. Тем не менее мутации аналогичного сигнала импорта у p66 не нарушали его локализацию в митохондриях, что может говорить о маскировании данного сигнала N-концевым SH2-доменом [44]. Показано, что p66shc ассоциируется с белковыми комплексами, содержащими субъединицы TIM и TOM, а также mHSP70 и определяющими транспорт белков в митохондрии. Предполагается, что в этом комплексе p66 не активен, но при окислительном стрессе диссоциирует из него, переходя в активную форму [46].

Согласно данным [35], сигнальный путь, запускающий транслокацию p66shc в митохондрию, при обработке перекисью водорода включает активацию РКСβ, которая фосфорилирует p66 по S36. Фосфорилированный p66shc становится мишенью пролилизомеразы Pin-1, которая узнает пролин, следующий за фосфорилированным остатком серина. После изомеризации p66shc дефосфорилируется фосфатазой PP2A и транспортируется в митохондрии. Последнее согласуется с тем фактом, что пул p66shc в митохондриях не фосфорилирован [15] (см. рис. 4). Также показано [35], что отсутствие p66 приводит к изменению кальциевой сигнализации и предотвращает

дробление митохондрий, что, в свою очередь, связывают с устойчивостью к апоптозу.

Оксидоредуктазная проапоптотическая активность р66shc и образование АФК. По современным представлениям при развитии митохондриально-зависимого апоптоза различные сигналы (АФК, повышенная концентрация кальция в цитоплазме, разобщение окислительного фосфорилирования) вызывают образование динамичного мультисубъединичного белкового комплекса, образующего пору во внутренней мембране митохондрий. Пермеаблизация внутренней и внешней мембран приводит к выходу Cyt C и других белков в цитоплазму, образованию апоптосомы и активации каспаз [47].

Механизм, объясняющий роль р66shc в митохондриально-зависимом апоптозе, предложили Pelicci и соавт. [15]. Оказалось, что р66shc необходим для снижения мембранного потенциала и выхода Cyt C в цитозоль. Более того, добавление циклоспорина А, ингибитора образования митохондриальной поры, блокировало проапоптотическую функцию р66 [17]. В *in vitro*-экспериментах добавление рекомбинантного р66shc к изолированным митохондриям с проницаемой внешней мембраной приводило к набуханию митохондрий в результате образования апоптотических пор. Этот эффект также блокировался циклоспорином А, снимался добавлением каталазы, антиоксиданта диметилтиомочевина (ДМТМ), ингибитора III-го комплекса дыхательной цепи антимицина А, а также требовал субстратов дыхания. Таким образом, полученные данные свидетельствовали, что образование митохондриальной апоптотической поры является ключевым шагом в развитии р66-зависимого апоптоза, и для данного эффекта необходимы АФК и дыхание.

Дальнейшие эксперименты с использованием электрохимического анализа и флуоресцентных редокс-чувствительных проб показали, что р66 действует как оксидоредуктаза, взаимодействующая с восстановленным Cyt C и переносящая от него электроны на кислород. За взаимодействие с Cyt C отвечает СВ-домен, что доказано с помощью ELISA и точечного мутагенеза [17]. В результате неполного восстановления кислорода образуются АФК, вызывающие формирование апоптотических митохондриальных пор. В подтверждение этой гипотезы АФК образуются при смешивании митохондрий и р66 даже в отсутствие субстратов дыхания при наличии пары аскорбат/ТМФД, специфично восстанавливающей Cyt C. Образование АФК наблюдалось и в отсутствие митохондрий при смешивании белков Cyt C и р66shc, однако в этом случае требовалось присутствие ионов меди.

Таким образом, группой Pelicci предложен следующий механизм проапоптотического действия р66shc (см. рис. 4): в нормальных условиях р66shc инактивирован и находится в составе высокомолекулярного комплекса, содержащего субъединицы ТОМ, ТИМ и mHSP70. В результате окислительного стресса р66shc высвобождается из комплекса и, действуя, как оксидоредуктаза, переносит электроны с восстановленного Cyt C на кислород. В результате неполного восстановления кислорода образуются АФК, приводящие к формированию апоптотической поры, набуханию митохондрий, выходу Cyt C в цитозоль, сборке апоптосомного комплекса и активации каспаз.

Важно учесть, что предложенный механизм оксидоредуктазной активности р66shc, где Cyt C выступает в качестве донора электронов, показан только *in vitro*. Для подтверждения данной гипотезы необходимы дополнительные опыты, включающие использование флуоресцентных зондов для измерения уровня АФК специфично в митохондриях клеток с неактивной дыхательной цепью (Rho-0 клеток), а также клеток с генетическим нокаутом гена *Cyt C*.

Необходимо отметить, что описанная схема имеет довольно много слабых мест. Так, например, у р66shc не обнаружено каких-либо известных редокс-доменов или доменов, способных связывать ионы металлов. Его способность генерировать АФК только в присутствии ионов меди может быть артефактом, поскольку ионы меди, как известно, могут генерировать АФК в реакции Фентона, что может значительно повлиять на сигнал при использовании редокс-чувствительных флуоресцентных зондов. Известно также, что Cyt C при переходе в олигомерное состояние способен генерировать АФК в результате автоокисления [48–52]. Учитывая эти обстоятельства, можно предположить, что при взаимодействии с Cyt C р66shc ведет себя не как оксидоредуктаза, а как фактор, способствующий олигомеризации и автоокислению цитохрома, подобно протимозину α [53].

Исследование изолированного СН2-СВ-домена. Механизм действия р66shc изучали также на его изолированном СН2-СВ-домене *in vitro* [54]. Оказалось, что рекомбинантный СН2-СВ-домен существует в двух формах: восстановленной – в виде димера, и окисленной – в виде тетрамера (или димера димеров), который содержит дисульфидные мостики между остатками С59. Добавление СН2-СВ-домена, как и полноразмерного белка, к митохондриям приводило к образованию апоптотических пор и набуханию органелл, однако подобной проапоптотической активностью обладала только тетрамерная форма.

Тем не менее в противоположность данным работы [15], в которой генерацию АФК напрямую связывали с образованием апоптотических пор, тетрамерная форма генерировала значительно меньше АФК, чем димер при смешивании с изолированными митохондриями.

Кроме того, показано, что домен СН2-СВ способен вызывать образование АФК в присутствии донора электронов дитионита и ионов меди. Однако этот эффект не воспроизводился при замене дитионита на Cyt C в качестве донора электронов. Вероятно, для взаимодействия р66shc с Cyt C необходимы другие домены р66, либо они нужны для правильной конформации СН2-СВ-домена при связывании Cyt C.

В результате была предложена модель р66-зависимого апоптоза, согласно которой в нормальных условиях тетрамерная форма р66 восстанавливается антиоксидантными системами митохондрий. В условиях стресса, напротив, антиоксидантные защитные системы не способны поддерживать р66 в восстановленной димерной форме, и образовавшийся тетрамер локально генерирует АФК, приводя к появлению апоптотической поры и запуску апоптоза.

Важно отметить, что АФК-образующая и индуцирующая апоптоз функции р66shc могут не быть прямо связаны. В пользу данного утверждения свидетельствует более низкий уровень генерации АФК апоптоз-индуцирующим тетрамерным р66shc по сравнению с димером, не приводящим к образованию апоптотических пор.

р66shc как редокс-сенсор. Дальнейшие эксперименты с изолированным СН2-СВ-доменом выявили новый партнер р66shc – пероксиредоксин 1 (Prx1) [55]. Prx1 относится к пероксидазам, которые регулируют редокс-баланс в клетке. Он может существовать в виде димера, декамера (состоит из пяти димеров) и мультимера. Prx1 локализован преимущественно в цитозоле, хотя недавние протеомные исследования показали его наличие в межмембранном пространстве митохондрий. В нормальных условиях в клетке преобладает димер, который работает как пероксидаза, в условиях же стресса Prx1 окисляется и переходит в декамерную форму, у которой значительно снижена пероксидазная активность. При этом у Prx1 появляется способность работать как шаперон. Сильный окислительный стресс или тепловой шок приводят к образованию мультимера, не обладающего пероксидазной активностью и также действующего как шаперон [56–58].

При взаимодействии с Prx1 СН2-СВ-доменом р66shc способствует дестабилизации декамерного Prx1 и переходу Prx1 в димерную форму. В свою

очередь, Prx1 в комплексе с р66shc поддерживает р66shc в димерной форме за счет дисульфидного обмена между двумя белками. Образовавшийся комплекс состоит из димерного р66shc, который способен генерировать АФК, но обладает низкой проапоптотической активностью, и димерного Prx1, функционирующего как пероксидаза. Таким образом, в нормальных условиях димерный Prx1 поддерживает р66shc в неактивном состоянии, деградируя производимые им АФК за счет своей пероксидазной активности. При наступлении окислительного стресса остатки цистеина, входящие в этот комплекс, окисляются, комплекс распадается, в результате чего освободившийся р66shc может участвовать в индукции апоптоза [55]. Таким образом, комплекс димерного р66shc и димерного Prx1 можно рассматривать как редокс-сенсор, реагирующий на уровень АФК в клетке и способный запустить апоптоз при их избыточном накоплении (см. рис. 4).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, согласно современным данным, р66shc – это проапоптотический белок, регулирующий окислительный стресс и запускающий митохондриальный путь апоптоза за счет оксидоредуктазной активности. Несмотря на активное изучение физиологической роли р66shc, довольно мало известно о точном механизме действия этого белка, определяющим его редокс-активность, а также участие в индукции апоптоза. Предметом дальнейших исследований станет уточнение механизма транслокации р66shc в митохондрии, а также локализации р66shc-зависимой продукции АФК в клетке. Хотя фосфорилирование р66shc по S36 относится к одному из необходимых шагов в развитии апоптоза, показано, что митохондриальный пул р66 не фосфорилирован. Это указывает на то, что фосфорилирование р66 по S36 участвует, возможно, в немитохондриальной активности, связанной с его проапоптотической функцией.

Р66shc представляет интерес для изучения регуляции окислительного стресса, апоптоза и связанного с ними старения. Важно отметить, что для определения перспектив применения р66 при связанных с возрастом заболеваниях необходимо выяснить его роль в развитии рака. Более глубокое понимание регуляторных путей, а также структурных и механистических основ редокс-активности р66shc может быть использовано в фармакотерапии заболеваний, ассоциированных со старением. ●

Автор выражает признательность Б.В. Черняку и В.П. Скулачеву за ряд ценных замечаний и помощь в подготовке рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Longo V.D., Mitteldorf J., Skulachev V.P. // *Nat. Rev. Genet.* 2005. V. 6. № 11. P. 866–872.
2. Migliaccio E., Giorgio M., Mele S., Pelicci G., Reboldi P., Pandolfi P.P., Lanfrancone L., Pelicci P.G. // *Nature.* 1999. V. 402. № 6759. P. 309–313.
3. Napoli C., Martin-Padura I., de Nigris F., Giorgio M., Mansueti G., Somma P., Condorelli M., Sica G., De Rosa G., Pelicci P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. № 4. P. 2112–2116.
4. Camici G.G., Schiavoni M., Francia P., Bachschmid M., Martin-Padura I., Hersberger M., Tanner F.C., Pelicci P., Volpe M., Anversa P., Luscher T.F., Cosentino F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. № 12. P. 5217–5222.
5. Menini S., Amadio L., Oddi G., Ricci C., Pesce C., Pugliese F., Giorgio M., Migliaccio E., Pelicci P., Iacobini C., Pugliese G. // *Diabetes.* 2006. V. 55. № 6. P. 1642–1650.
6. Menini S., Iacobini C., Ricci C., Oddi G., Pesce C., Pugliese F., Block K., Abboud H.E., Giorgio M., Migliaccio E., Pelicci P.G., Pugliese G. // *Diabetologia.* 2007. V. 50. № 9. P. 1997–2007.
7. Koch O.R., Fusco S., Ranieri S.C., Maulucci G., Palozza P., Larocca L.M., Cravero A.A., Farre S.M., De Spirito M., Galeotti T., Pani G. // *Lab. Invest.* 2008. V. 88. № 7. P. 750–760.
8. Luzi L., Confalonieri S., Di Fiore P.P., Pelicci P.G. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2000. V. 10. № 6. P. 668–674.
9. Fagiani E., Giardina G., Luzi L., Cesaroni M., Quarto M., Capra M., Germano G., Bono M., Capillo M., Pelicci P., Lanfrancone L. // *Cancer Res.* 2007. V. 67. № 7. P. 3064–3073.
10. Migliaccio E., Mele S., Salcini A.E., Pelicci G., Lai K.M., Superti-Furga G., Pawson T., Di Fiore P.P., Lanfrancone L., Pelicci P.G. // *EMBO J.* 1997. V. 16. № 4. P. 706–716.
11. Okada S., Kao A.W., Ceresa B.P., Blaikie P., Margolis B., Pessin J.E. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. № 44. P. 28042–28049.
12. Khanday F.A., Santhanam L., Kasuno K., Yamamori T., Naqvi A., Dericco J., Bugayenko A., Mattagajasingh I., Disanza A., Scita G., Irani K. // *J. Cell Biol.* 2006. V. 172. № 6. P. 817–822.
13. Arany I., Faisal A., Nagamine Y., Safirstein R.L. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. № 10. P. 6110–6117.
14. Trinei M., Giorgio M., Cicalese A., Barozzi S., Ventura A., Migliaccio E., Milia E., Padura I.M., Raker V.A., Maccarana M., Petronilli V., Minucci S., Bernardi P., Lanfrancone L., Pelicci P.G. // *Oncogene.* 2002. V. 21. № 24. P. 3872–3878.
15. Giorgio M., Migliaccio E., Orsini F., Paolucci D., Moroni M., Contursi C., Pelliccia G., Luzi L., Minucci S., Marcaccio M., Pinton P., Rizzuto R., Bernardi P., Paolucci F., Pelicci P.G. // *Cell.* 2005. V. 122. № 2. P. 221–233.
16. Francia P., delli Gatti C., Bachschmid M., Martin-Padura I., Savoia C., Migliaccio E., Pelicci P.G., Schiavoni M., Luscher T.F., Volpe M., Cosentino F. // *Circulation.* 2004. V. 110. № 18. P. 2889–2895.
17. Orsini F., Migliaccio E., Moroni M., Contursi C., Raker V.A., Piccini D., Martin-Padura I., Pelliccia G., Trinei M., Bono M., Puri C., Tacchetti C., Ferrini M., Mannucci R., Nicoletti I., Lanfrancone L., Giorgio M., Pelicci P.G. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 24. P. 25689–25695.
18. Xiao D., Singh S.V. // *Cancer Res.* 2010. V. 70. № 8. P. 3150–3158.
19. Graiani G., Lagrasta C., Migliaccio E., Spillmann F., Meloni M., Madeddu P., Quaini F., Padura I.M., Lanfrancone L., Pelicci P., Emanuelli C. // *Hypertension.* 2005. V. 46. № 2. P. 433–440.
20. Haga S., Terui K., Fukai M., Oikawa Y., Irani K., Furukawa H., Todo S., Ozaki M. // *J. Hepatol.* 2008. V. 48. № 3. P. 422–432.
21. Di Stefano V., Cencioni C., Zaccagnini G., Magenta A., Capogrossi M.C., Martelli F. // *Cardiovasc. Res.* 2009. V. 82. № 3. P. 421–429.
22. Almeida M., Han L., Ambrogini E., Bartell S.M., Manolagas S.C. // *Mol. Endocrinol.* 2010. V. 24. № 10. P. 2030–2037.
23. Smith W.W., Norton D.D., Gorospe M., Jiang H., Nemoto S., Holbrook N.J., Finkel T., Kusiak J.W. // *J. Cell Biol.* 2005. V. 169. № 2. P. 331–339.
24. Malhotra A., Vashistha H., Yadav V.S., Dube M.G., Kalra S.P., Abdellatif M., Meggs L.G. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2009. V. 296. № 2. P. H380–388.
25. Khanday F.A., Yamamori T., Mattagajasingh I., Zhang Z., Bugayenko A., Naqvi A., Santhanam L., Nabi N., Kasuno K., Day B.W., Irani K. // *Mol. Biol. Cell.* 2006. V. 17. № 1. P. 122–129.
26. Husain M., Meggs L.G., Vashistha H., Simoes S., Griffiths K.O., Kumar D., Mikulak J., Mathieson P.W., Saleem M.A., Del Valle L., Pina-Oviedo S., Wang J.Y., Seshan S.V., Malhotra A., Reiss K., Singhal P.C. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. № 24. P. 16648–16658.
27. Tiberi L., Faisal A., Rossi M., Di Tella L., Franceschi C., Salvioli S. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006. V. 342. № 2. P. 503–508.
28. Wu Z., Rogers B., Kachi S., Hackett S.F., Sick A., Campochiaro P.A. // *J. Cell. Physiol.* 2006. V. 209. № 3. P. 996–1005.
29. Carraro F., Pucci A., Pellegrini M., Pelicci P.G., Baldari C.T., Naldini A. // *J. Cell Physiol.* 2007. V. 211. № 2. P. 439–447.
30. Ma Z., Myers D.P., Wu R.F., Nwariaku F.E., Terada L.S. // *J. Cell Biol.* 2007. V. 179. № 1. P. 23–31.
31. Rota M., LeCapitaine N., Hosoda T., Boni A., De Angelis A., Padin-Iruegas M.E., Esposito G., Vitale S., Urbanek K., Casarsa C., Giorgio M., Luscher T.F., Pelicci P.G., Anversa P., Leri A., Kajstura J. // *Circ. Res.* 2006. V. 99. № 1. P. 42–52.
32. Rapino C., Bianchi G., Di Giulio C., Centurione L., Cacchio M., Antonucci A., Cataldi A. // *Aging Cell.* 2005. V. 4. № 4. P. 177–185.
33. Le S., Connors T.J., Maroney A.C. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 51. P. 48332–48336.
34. Hu Y., Wang X., Zeng L., Cai D.Y., Sabapathy K., Goff S.P., Firpo E.J., Li B. // *Mol. Biol. Cell.* 2005. V. 16. № 8. P. 3705–3718.
35. Pinton P., Rimessi A., Marchi S., Orsini F., Migliaccio E., Giorgio M., Contursi C., Minucci S., Mantovani F., Wieckowski M.R., Del Sal G., Pelicci P.G., Rizzuto R. // *Science.* 2007. V. 315. № 5812. P. 659–663.
36. Foschi M., Franchi F., Han J., La Villa G., Sorokin A. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 28. P. 26640–26647.
37. Faisal A., el-Shemerly M., Hess D., Nagamine Y. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 33. P. 30144–30152.
38. Sansone P., Storci G., Giovannini C., Pandolfi S., Pianetti S., Taffurelli M., Santini D., Ceccarelli C., Chieco P., Bonafe M. // *Stem Cells.* 2007. V. 25. № 3. P. 807–815.
39. Tomilov A.A., Bicocca V., Schoenfeld R.A., Giorgio M., Migliaccio E., Ramsey J.J., Hagopian K., Pelicci P.G., Cortopassi G.A. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. № 2. P. 1153–1165.
40. Nemoto S., Finkel T. // *Science.* 2002. V. 295. № 5564. P. 2450–2452.
41. Berniakovich I., Trinei M., Stendardo M., Migliaccio E., Minucci S., Bernardi P., Pelicci P.G., Giorgio M. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. № 49. P. 34283–34293.
42. Lebedzinska M., Karkucinska-Wieckowska A., Giorgi C., Karczmarewicz E., Pronicka E., Pinton P., Duszynski J., Pronicki M., Wieckowski M.R. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2010. V. 1797. № 6–7. P. 952–960.

43. Chahdi A., Sorokin A. // *Mol. Biol. Cell.* 2008. V. 19. № 6. P. 2609–2619.
44. Nemoto S., Combs C.A., French S., Ahn B.H., Fergusson M.M., Balaban R.S., Finkel T. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 15. P. 10555–10560.
45. Ventura A., Maccarana M., Raker V.A., Pelicci P.G. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 3. P. 2299–2306.
46. Orsini F., Moroni M., Contursi C., Yano M., Pelicci P., Giorgio M., Migliaccio E. // *Biol. Chem.* 2006. V. 387. № 10–11. P. 1405–1410.
47. Green D.R., Kroemer G. // *Science.* 2004. V. 305. № 5684. P. 626–629.
48. Margoliash E., Lustgarten J. // *J. Biol. Chem.* 1962. V. 237. P. 3397–3405.
49. Schejter A., Glauser S.C., George P., Margoliash E. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1963. V. 73. P. 641–643.
50. Person P., Fine A.S., Mora P.T., Zipper H. // *J. Biol. Chem.* 1965. V. 240. P. 3159–3164.
51. Margoliash E., Schejter A. // *Adv. Protein Chem.* 1966. V. 21. P. 113–286.
52. Petersen L.C., Cox R.P. // *Biochem. J.* 1980. V. 192. № 2. P. 687–693.
53. Markova O.V., Evstafieva A.G., Mansurova S.E., Moussine S.S., Palamarchuk L.A., Pereverzev M.O., Vartapetian A.B., Skulachev V.P. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2003. V. 1557. № 1–3. P. 109–117.
54. Gertz M., Fischer F., Wolters D., Steegborn C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. № 15. P. 5705–5709.
55. Gertz M., Fischer F., Leipelt M., Wolters D., Steegborn C. // *Ageing (Albany NY).* 2009. V. 1. № 2. P. 254–265.
56. Jang H.H., Lee K.O., Chi Y.H., Jung B.G., Park S.K., Park J.H., Lee J.R., Lee S.S., Moon J.C., Yun J.W., Choi Y.O., Kim W.Y., Kang J.S., Cheong G.W., Yun D.J., Rhee S.G., Cho M.J., Lee S.Y. // *Cell.* 2004. V. 117. № 5. P. 625–635.
57. Fourquet S., Huang M.E., D'Autreaux B., Toledano M.B. // *Antioxid. Redox Signal.* 2008. V. 10. № 9. P. 1565–1576.
58. Matsumura T., Okamoto K., Iwahara S., Hori H., Takahashi Y., Nishino T., Abe Y. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. № 1. P. 284–293.

УДК 575.22:595.341.4

Диминуция хроматина регулирует число генов рРНК у веслоногих раков

М. В. Загоскин^{1*}, Т. Л. Маршак², Д. В. Муха¹, А. К. Гришанин^{1#}¹Учреждение Российской академии наук Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991, Москва, ул. Губкина, 3²Учреждение Российской академии наук Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 26

*E-mail: zagoskin_mv@mail.ru, #andreygrishanin@mail.ru

Поступила в редакцию 20.09.2010 г.

РЕФЕРАТ Методом ПЦР в реальном времени получены данные, показывающие, что в результате 16-кратной редукции генома *Cyclops kolensis* (15.3 пг до и 0.98 пг после диминуции хроматина) число копий генов рРНК в геноме клеток соматической линии уменьшается более чем на два порядка. Предполагается, что диминуцию хроматина можно рассматривать как механизм регулирования числа копий рДНК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА диминуция хроматина, гены рибосомной РНК, Copepoda, ПЦР в реальном времени, копияемость генов.

ВВЕДЕНИЕ

Диминуция хроматина (ДХ) – это запрограммированный процесс удаления значительной части хроматина из генома клеток-предшественников соматической линии, встречающийся на ранних этапах развития некоторых многоклеточных эукариот, или из соматического ядра (макронуклеуса) в ходе его формирования у простейших. Явление ДХ известно уже более 100 лет, тем не менее, оно обнаружено у весьма ограниченного числа видов (менее 100), принадлежащих столь же небольшому количеству групп организмов: простейшие, нематоды, миксины, веслоногие раки [1, 2]. Насчитывается около 20 видов циклопов, у которых описана ДХ [1].

В геноме большинства видов эукариот гены рРНК представлены большим числом копий и организованы в виде цистрона. Тандемно повторяющиеся копии рДНК формируют один или несколько кластеров, которые могут располагаться на одной или нескольких хромосомах [3]. За последние несколько десятков лет накоплено множество сведений о структурно-функциональной организации генов рРНК [4–6]. Исследования последних лет направлены главным образом на изучение механизмов регуляции транскрипционной активности генов рРНК. Следует заметить, что молекулы рРНК составляют более половины всех синтезируемых в клетке РНК [6], а на гены рРНК приходится порядка 35–60% всей транскрипционной активности, осуществляемой в клетке [7].

Известно, что количество копий генов рРНК в геноме эукариот варьирует в весьма широких преде-

лах – от 39 до 19300 у животных и от 150 до 26048 у растений [8]. Описан ряд случаев, когда изменяется число копий рДНК, в том числе увеличение количества рДНК вследствие амплификации внехромосомных копий генов рРНК в ооцитах *Xenopus laevis* [9–11] или у простейших [12]. Число генов рРНК так же может уменьшаться, как у *Drosophila melanogaster* с мутацией *bobbed* (*bb*), но при этом к третьему-четвертому поколению количество повторов рДНК полностью восстанавливается [13–18]. Изменения копияемости рДНК в геноме хотя и являются скорее исключениями, однако наводят на мысль о существовании механизмов регуляции числа копий генов рРНК и их поддержания на определенном уровне.

Запрограммированное удаление генов в ходе онтогенеза происходит и в результате ДХ. Хотя обнаружено оно пока только у двух видов круглых червей – *Ascaris lumbricoides* и *A. suum*. У *A. lumbricoides* вырезается ген, кодирующий рибосомный белок ALER-1 [19], а у *A. suum* к настоящему времени обнаружены три уникальных гена, элиминируемых при ДХ: *rpS19G*, *fert-1*, *aleg-3* и ретротранспозон *Tas* [20–22], остальная часть элиминируемых последовательностей относится к некодирующим. Неоднократно уже отмечалось, что ДХ может оказаться удобной моделью для изучения проблемы избыточной ДНК и реорганизации генома в ходе онтогенеза. Однако значимость ДХ недооценена в связи с недостаточным количеством данных [23, 24].

Несмотря на то что во время ДХ у *Cyclops kolensis* удаляется 94% ДНК [25], до сих пор в элиминируемой

фракции генома обнаруживали только некодирующие нуклеотидные последовательности, насыщенные повторами, либо сателлитную ДНК [26–28]. Ранее было высказано предположение о возможности удаления части цистронов рибосомных генов из хромосом *C. kolensis* в результате ДХ [29]. Положительную корреляцию между размером генома и числом копий рДНК отмечали Прокопович и соавт. [8].

В настоящей работе были поставлены следующие задачи: установить соотношение между числом копий генов рРНК в додимируционном и последимируционном геноме *C. kolensis* и определить число копий генов рРНК в российской популяции *C. insignis* – вида, у которого не обнаружено ДХ [30]. С этой целью мы использовали метод ПЦР в реальном времени. Наряду с другими методами определения копийности генов, метод ПЦР в реальном времени на сегодняшний день наиболее удобный и точный [31–33].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Циклопов *C. kolensis* Lill. и *C. insignis* Claus отлавливали в пруду на Воробьевых горах (Москва, Россия) в апреле 2009–2010 гг.

Цитофотометрия

В методику [25, 34] приготовления препаратов эмбриональных и соматических клеток взрослых особей *C. kolensis* для последующей их окраски по Фельгену были внесены модификации, предполагающие разрушение оболочек яйцевого мешка и яйца. В качестве эталона для вычисления абсолютного количества ДНК мы использовали спермии и эритроциты вьюна, содержание ДНК в клетках которого составляет $1C = 2.4$ пг [35]. Спермии вьюна содержат $1C = 2.4 \pm 0.2$ (SD) пг ДНК, эритроциты – $2C = 5.1 \pm 0.4$ (SD) пг. Содержание ДНК измеряли в 100 эритроцитах и 127 спермиях вьюна. Для приготовления мазков спермиев кусочки семенника вьюна измельчали в стандартном физиологическом растворе и из образовавшейся взвеси клеток готовили мазки. После высушивания препараты фиксировали в течение 10 мин в 96% этиловом спирте при комнатной температуре. Циклопов предварительно фиксировали в смеси этилового спирта и уксусной кислоты (3 : 1), раздавливали в 45% уксусной кислоте с полным разрушением оболочек яйцевого мешка и самого яйца, а затем окрашивали по Фельгену для измерения количества ДНК. Ядра клеток окрашивали по Фельгену в следующих условиях: гидролиз в 5 н. HCl в течение 11 мин при 37°C; окрашивание в реактиве Шиффа (1 ч при комнатной температуре). Измерения проводили на микроденситометре Виккерс М86 (Англия) (длина волны 540 нм). Все препараты, используемые для измерений, обрабатывали одно-

временно. Было исследовано 59 клеток 2-го направительного тельца на стадии метафазы с додимируционным геномом и 140 клеток соматической линии взрослого циклопа после ДХ на стадии анафазы ($n = 47$) и интерфазы ($n = 93$). Результаты обрабатывали с использованием программы Microsoft Excel 2007 (описательная статистика).

Сбор материала и выделение ДНК

В качестве «додимируционного» материала отбирали яйцевые мешки *C. kolensis* с зародышами на стадии 4–8 клеток. Отбор таких зародышей проводили по ранее описанной методике [25], позволяющей определять *in vivo* стадию дробления зародыша циклопа в световом микроскопе. «Последимируционным» материалом служили антеннулы *C. kolensis*, содержащие только соматические клетки. У каждой особи под биноклем скальпелем отрезали по две антеннулы, переносили на стекло, расположенное на столике, охлаждаемом жидким азотом. Яйцевые мешки также фиксировали в жидком азоте. Отбирали особей *C. insignis* с яйцевыми мешками, в онтогенезе которого ДХ отсутствует.

Поскольку в нашем распоряжении находилось небольшое количество материала, суммарную ДНК выделяли с помощью набора реактивов «Diatom™ DNA Prep 100» производства ООО «Лаборатория Изоген». Этот набор позволяет минимизировать потери ДНК при выделении, принцип его действия основан на лизисе образца в гуанидинтиоцианате (сильном хаотропном агенте) с последующей сорбцией ДНК на силикагеле. Предварительно материал гомогенизировали в буфере (0.2 М Трис, 50 мМ EDTA, 0.5% SDS, 200 мкг/мл протеиназы К) и лизировали в течение 1 ч при 50°C. Лизат обрабатывали РНКазой (0.1 мг/мл) в течение 5 мин, а затем ДНК выделяли по методике, рекомендованной производителем.

ПЦР в реальном времени с использованием красителя EVA Green

Концентрации суммарной ДНК *C. kolensis* до и после ДХ и *C. insignis* определяли на спектрофотометре Nanodrop 1000. Коэффициент вариации концентрации, вычисленный по результатам трех измерений, составил 1.33% (до ДХ) и 5.91% (после ДХ) у *C. kolensis* и 9.18% у *C. insignis*.

Для проведения ПРЦ в реальном времени нами были сконструированы специфические праймеры: 28real_for – 5'-GGTAGCCAAATGCCTCGTC-3', 28real_rev – 5'-CGCCAAAGATGCTCCGCCAC-3', позволяющие амплифицировать фрагмент длиной 183 п.н. гена 28S рРНК. Нуклеотидные последовательности этого фрагмента гена 28S рРНК у *C. kolensis* и *C. insignis* были одинаковыми.

ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторе iCycler iQ4 производства Bio-Rad (США). Расчет данных производили с помощью программного обеспечения iQ5 Optical System Software. Пороговую величину накопления продуктов амплификации определяли в результате визуального анализа кривых накопления ПЦР-продуктов. Эта величина находилась в участке экспоненциального роста кривых и во всех расчетах равнялась 100.

ПЦР в реальном времени проводили с использованием «Реакционной смеси 2.5x для проведения ПЦР-РВ в присутствии EVA Green и референсного красителя ROX» фирмы «Синтол» (Россия). Реакцию проводили согласно рекомендациям производителя в объеме 25 мкл: 11 мкл воды ПЦР-стандарта, 10 мкл готовой реакционной смеси (включающей дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, ПЦР-буфер, MgCl₂ и Taq-ДНК-полимеразу с антителами, ингибирующими активность фермента), 1 мкл каждого праймера (конечная концентрация 0.4 пмоль/мкл) и 2 мкл ДНК-матрицы. Условия ПЦР в реальном времени были следующими: первичная денатурация в течение 4.5 мин при 95°C, за которой следовали 50 циклов: 95°C – 15 с, 64°C – 15 с, 72°C – 20 с. Флуоресцентный сигнал детектировали на стадии отжига при 64°C. После амплификации строили кривую плавления с градиентом температуры 0.5°C – от 55 до 94.5°C, подтвердившую наличие только одного специфического продукта амплификации во всех образцах.

Получение плазмидной ДНК

ПЦР-продукт гена 28S рРНК *S. kolensis* длиной 2199 п.н. клонировали в векторе рGEM-T Easy (Promega) и получили плазмиду рGEM-20b1. Плазмидную ДНК (пДНК) очищали на колонках с помощью набора «Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System» (Promega, США) согласно инструкциям фирмы, включая обработку РНКазой А. Для приближения к условиям амплификации линейной ДНК, полученную кольцевую пДНК расщепляли рестриктазой PstI по сайту, который входит в состав полилинкера плазмиды и отсутствует во вставке. Плазмиду рGEM-20b1 (2.6 мкг) обрабатывали 2 мкл рестриктазы PstI (Fermentas) в объеме 50 мкл: 23 мкл очищенной воды, 5 мкл 10×Буфера, 20 мкл пДНК. После 3 ч инкубации при 37°C плазмиду очищали фенол-хлороформным методом и растворяли в том же буфере, что и образцы геномной ДНК.

Построение калибровочной кривой для определения числа копий рДНК

В методе абсолютного определения количества копий генов рРНК использовалась калибровочная кривая. Для ее построения использовали серию пятикрат-

ных разведений рGEM-20b1/PstI – от 1 нг до 0.32 пг. Каждое разведение пДНК было представлено в двух повторностях. Исходную концентрацию плазмиды измеряли на спектрофотометре Nanodrop 1000 с четырьмя повторностями, коэффициент вариации составил 2.36%. Калибровочная кривая имела следующие характеристики: коэффициент корреляции (R²) – 0.996, наклон кривой (slope) – -3.760, эффективность (E) – 84.5% (рисунок).

Размер плазмиды со вставкой равен 5216 п.н. Исходя из нуклеотидного состава, в программе OligoII Mass Calculator v.1.0 определили молярную массу плазмиды в двухцепочечной форме (M = 3.23 × 10⁶ г/моль). Количество молекул плазмидной ДНК рассчитывали по формуле (1):

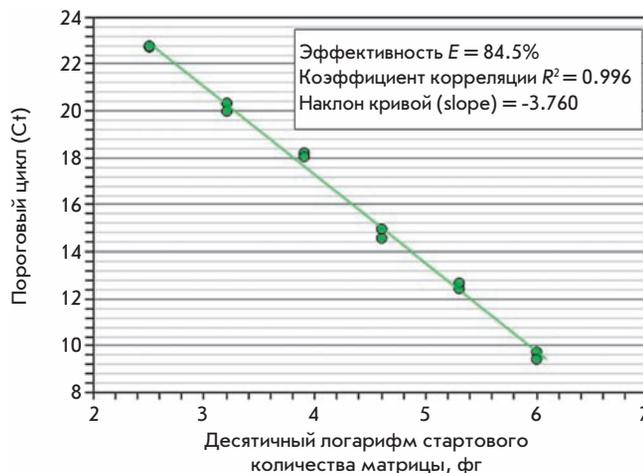
$$N_p (\text{копий}) = \frac{N_A \cdot m}{M} = \frac{6.02 \times 10^{23} (\text{копий} \cdot \text{моль}^{-1}) \times 1 \times 10^{-15} (\text{г})}{3.23 \times 10^6 (\text{г} \cdot \text{моль}^{-1})} = 186.378 \approx 186, (1)$$

где N_p – количество молекул плазмидной ДНК, проходящее на 1 фг пДНК; N_A – число Авогадро; m – количество ДНК, для которого рассчитывается число копий; M – молярная масса плазмиды. Показано, что на 1 фг пДНК приходится около 186 молекул пДНК.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Цитофотометрия

Ранее было показано, что гаплоидный геном эмбриональных и соматических клеток взрослых особей *S. insignis* содержит 2.1–2.15 пг ДНК [30].



Калибровочная кривая, использованная в методе абсолютного определения количества копий генов рРНК.

На начальных этапах исследования ДХ мы испытывали некоторые методические трудности при приготовлении препаратов *C. kolensis* для цитофотометрии [25, 36]. Поэтому для расчета числа копий генов рРНК в клетках *C. kolensis* до и после ДХ мы повторно измерили количество ДНК в клетках *C. kolensis* методом количественной цитофотометрии. Результаты проведенных измерений свидетельствуют об изменении абсолютного количества ДНК в клетках *C. kolensis* до и после ДХ. Додиминирующий геном содержал $1C = 15.3 \pm 3.1$ (SD) пг ядерной ДНК, а клетки соматической линии после ДХ на стадии анафазы – 0.98 ± 0.13 (SD) пг в пересчете на гаплоидный геном. Относительное количество элиминированной ДНК осталось неизменным и составило 94%, что соответствует данным [25, 34]. Результаты цитофотометрических измерений позволяют оценить число клеток, приходящееся на определенное количество до- и последиминирующей ДНК *C. kolensis* и ДНК *C. insignis*.

Определение относительного числа копий генов рРНК методом $2^{-\Delta C'_T}$ [37]

К моменту проведения нашей работы у исследуемых видов не были известны нуклеотидные последовательности каких-либо генов, поэтому провести опыт с внутренним контролем и измерениями относительно одного или нескольких референсных генов не представлялось возможным. В связи с этим проведено внешнее нормирование по количеству ДНК, взятой в реакцию, т.е. сравнили одинаковые количества ДНК *C. kolensis* до и после ДХ и *C. in-*

signis. Реакцию проводили с 500, 400, 300 и 200 пг ДНК. Каждый образец был представлен в трех повторностях. При определении относительных количеств по одному гену, как в нашем случае, для обработки результатов ПЦР используется метод $2^{-\Delta C'_T}$. Референсными образцами при расчете $\Delta C'_T$ служили образцы с последиминирующей ДНК *C. kolensis* (табл. 1). Поскольку в результате ДХ размер генома уменьшается в 15.6 раза, то одно и то же число клеток до и после ДХ содержит разное количество ДНК. Учитывая это, фактическое соотношение числа копий рДНК будет отличаться от полученного значения $2^{-\Delta C'_T}$ в 15.6 раза. Это же справедливо и для *C. insignis*, диплоидный геном которого в 2.2 раза превышает последиминирующий геном *C. kolensis* (табл. 1).

Определение абсолютного числа копий генов рРНК с использованием калибровочной кривой

Мы попытались определить абсолютное число копий генов рРНК с использованием калибровочной кривой. Калибровочную кривую строили на основе серии пятикратных разведений пДНК рGEM-20b1/PstI, каждая копия которой содержала по одному фрагменту гена 28S рРНК. Стартовые количества матрицы в образцах определяли относительно 500, 400, 300 и 200 пг пДНК так же, как и при расчете предыдущим методом.

С учетом различий в размере генома образцов на основе результатов ПЦР в реальном времени для каждого количества анализируемой ДНК определяли число копий рДНК, приходящееся на дипло-

Таблица 1. Расчет относительного количества копий генов рРНК методом $2^{-\Delta C'_T}$

Параметры расчета	Образцы ДНК	Количество ДНК, взятой в реакцию, пг				Среднее значение	Стандартное отклонение	Коэффициент вариации, %
		500	400	300	200			
$\Delta C'_T$	<i>C. kolensis</i> до ДХ	-5.08	-4.99	-4.93	-4.88	-4.97	±0.09	1.7
	<i>C. insignis</i>	-2.96	-2.72	-2.67	-2.63	-2.75	±0.15	5.4
$2^{-\Delta C'_T}$	<i>C. kolensis</i> до ДХ	33.82	31.78	30.48	29.45	31.38	±1.88	6.0
	<i>C. insignis</i>	7.78	6.59	6.36	6.19	6.73	±0.72	10.7
Относительное количество копий (относительно <i>C. kolensis</i> после ДХ)	<i>C. kolensis</i> до ДХ	528.01	496.16	475.86	459.78	489.95	±29.41	6.0
	<i>C. insignis</i>	121.48	102.86	99.36	96.64	105.09	±11.22	10.7

идный геном (табл. 2). Для расчета использовали формулу (2):

$$N_r(\text{копий}) = \frac{N_m(\phi\epsilon) \cdot N_p(\text{копий} \cdot \phi\epsilon^{-1}) \cdot 2C(n\epsilon)}{k(n\epsilon)}, \quad (2)$$

где N_r – количество копий рДНК (28S), $2C$ – размер диплоидного генома, N_m – исходное количество матрицы гена 28S рРНК, определенное в ходе опыта, N_p – количество молекул пДНК, приходящееся на 1 фг пДНК (см. формулу 1), k – количество анализируемой ДНК, взятой в реакцию.

Таким образом, средние значения соотношения между количеством генов рРНК при расчете с использованием калибровочной кривой в до- и последиминуционном геноме *C. kolensis* составляют 329.94 ± 19.09 (табл. 2), а между геномом *C. insignis* и последиминуционным геномом *C. kolensis* – 11.73 ± 1.16 .

ОБСУЖДЕНИЕ

Использованные методы расчета числа копий генов требуют ряда допущений. Основное допущение в случае метода $2^{-\Delta\text{CT}}$ – предположение о 100% эффективности реакции, что на практике мало достижимо. При использовании калибровочной кривой, построенной на основе пДНК, допускается, что пДНК в ходе ПЦР амплифицируется с той же эффективностью, что и исследуемые образцы. Таким образом, наблюдаемые различия в соотношениях числа копий рДНК проистекают непосредственно из особенностей методов расчета.

В результате проведенной работы было установлено, что в ходе ДХ из генома пресоматических клеток *C. kolensis* удаляется значительная часть генов рРНК, т.е. наряду с уменьшением генома почти в 16 раз происходит уменьшение числа копий генов рРНК. Отметим, что это первое описание удаления генов у циклопов посредством ДХ. Более того, никаких свидетельств удаления рДНК у многоклеточных организмов в результате ДХ ранее не было описано.

Возможно, что удаление генов рРНК обусловлено необходимостью привести число генов рРНК в соответствие с размером генома. Положительную корреляцию между размером генома и числом копий генов рРНК наблюдали также Прокопович и соавт. [8]. Недавно в результате элегантного эксперимента с дрожжами было показано, что большое количество повторов генов рРНК важно для поддержания стабильности генома в целом [38]. В частности, установлено, что избыточные копии рДНК облегчают ассоциацию сестринских хроматид, что важно для эффективной рекомбинационной репарации. Заметим, что удаление копий рДНК происходит далеко не пропорционально уменьшению генома в результате ДХ. Этот факт не вызывает удивления, так как гены рРНК обычно локализованы в ядрышков-образующих организаторах определенных хромосом и образуют, как правило, один или несколько кластеров [3], а не распределены равномерно по геному. Следовательно, должны существовать точные механизмы, позволяющие безошибочно вырезать ту часть генов рРНК, потеря которой не приведет к функциональной недостаточности этих генов в клетках сомати-

Таблица 2. Расчет абсолютного и относительного количества копий генов рРНК с использованием калибровочной кривой

Параметры расчета	Образцы ДНК	Количество ДНК, взятой в реакцию, пг			
		500	400	300	200
Среднее значение стартового количества матрицы (фг) со стандартным отклонением	<i>C. kolensis</i> до ДХ	135±23.2	102±21.3	71.7±18.1	50.3±1.89
	<i>C. kolensis</i> после ДХ	5.99±0.953	4.73±0.553	3.45±0.579	2.56±0.447
	<i>C. insignis</i>	37±8.11	25.3±6.13	17.8±3.36	12.7±1.2
Количество копий рДНК на диплоидный геном, N_r	<i>C. kolensis</i> до ДХ	1539.86	1454.31	1363.06	1434.35
	<i>C. kolensis</i> после ДХ	4.38	4.32	4.20	4.68
	<i>C. insignis</i>	58.62	50.10	47.00	50.30
Соотношение числа копий рДНК $N_r(\text{до})/ N_r(\text{после})$		351.86	336.67	324.46	306.76
Соотношение числа копий рДНК $N_r(C. insignis)/ N_r(\text{после})$		13.39	11.60	11.19	10.76

ческой линии. Кроме того, не все копии генов рРНК могут быть активными, а число активных копий может изменяться в ходе онтогенеза. Различают три состояния рДНК – в одном идет активная транскрипция генов рРНК, в другом гены не транскрибируются, но подготовлены к началу транскрипции и имеют, как и в первом случае, эухроматиновую структуру. Выделяют также плотноупакованную нетранскрибируемую рДНК, которая имеет гетерохроматиновую структуру [6]. Возможно, в ходе ДХ одна из этих фракций, вероятнее всего гетерохроматиновая, удаляется из генома. Нельзя исключать и возможности равномерного удаления копий рДНК из всех трех фракций рДНК.

Логично было бы предположить, что при ДХ сохраняются преимущественно функциональные копии рДНК. Известно, что значительная часть копий рДНК дрозофилы и других организмов [39, 40] поражена специфическими мобильными элементами (R1, R2), встраивание которых приводит к инактивации копий рДНК. Возможно, именно такие копии и удаляются в ходе ДХ у *C. kolensis*.

Транскрипция рибосомных генов является ключевым звеном в регуляции общего уровня синтеза белка в клетке [41, 42]. Как показано в нашей работе, геном *C. insignis*, у которого отсутствует ДХ, по числу копий рДНК в большей степени сходен с последиминуционным геномом *C. kolensis*, чем с додимиционным.

Активная экспрессия генов рРНК и наработка большого числа рибосом вполне оправдана на ранних стадиях развития, однако ДХ происходит на стадии 4-го деления дробления, когда активная экспрессия каких-либо генов еще не началась, и развитие идет за счет запасенных молекул. Следовательно, избыток генов в додимиционных бластомерах не должен

сказываться на количестве рибосом в клетках зародыша. Возможно, элиминируемые копии участвуют в созревании половых клеток, где может требоваться большее число рибосом.

Ранее высказывалось предположение, что ДХ у *C. kolensis* представляет собой этап развития, в ходе которого совершается переход с цитоплазматической регуляции экспрессии генов во время первых делений дробления, определяемой детерминантами, уже присутствующими в цитоплазме неоплодотворенного яйца, на ядерную регуляцию [1, 29]. Следовательно, исходно высокое содержание генов рРНК на додимиционном этапе развития зародыша *C. kolensis* реализоваться, по-видимому, не может, но число генов рРНК в развивающемся ооците в сотни раз превышает число генов в последиминуционном геноме соматических клеток и вполне может определять более высокий уровень экспрессии генов рРНК в оогенезе, когда происходит накопление рРНК, необходимых для первых делений дробления.

В завершение хотелось бы отметить, что изучение внутригеномной изменчивости количества рДНК у *C. kolensis* в результате ДХ имеет непосредственное отношение к пониманию механизмов регуляции и поддержания числа копий рДНК в геноме эукариот. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 10-04-01376, Программы фундаментальных исследований РАН «Биоразнообразие и динамика генофондов» и ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 годы» (ГК 16.740.11.0238). Мы хотели бы выразить глубокую благодарность нашему бессменному помощнику и другу Т.А. Кетовой за ее неоценимую помощь при сборе материала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гришанин А.К., Шеховцов А.К., Бойкова Т.В., Акифьев А.П., Жимулев И.Ф. // Цитология. 2006. Т. 48. № 5. С. 379–397.
2. Tobler H. // Germ line-soma differentiation; results and problems in cell differentiation / Ed. Hennig W. Berlin: Springer, 1986. V. 13. P. 1–69.
3. Gerbi S.A. // Mol. Evol. Genet. N.Y.: Plenum Press, 1985. P. 419–517.
4. Derenzini M., Pasquinelli G., O'Donohue M.F., Ploton D., Thiry M. // J. Histochem. Cytochem. 2006. V. 54. № 2. P. 131–145.
5. Hernandez-Verdun D. // Histochem. Cell Biol. 2006. V. 126. № 2. P. 135–148.
6. Huang S., Rothblum L.I., Chen D. // Biochem. Cell Biol. 2006. V. 84(4). P. 444–449.
7. Santoro R. // Cell. Mol. Life Sci. 2005. V. 62. P. 2067–2079.
8. Prokopowich C.D., Gregory T.R., Crease T.J. // Genome. 2003. V. 46. № 1. P. 48–50.
9. Bakken A.H. // J. Histochem. Cytochem. 1975. V. 23. №7. P. 463–474.
10. Gall J.G. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1968. V. 60. P. 553–559.
11. Gall J.G. // Genetics. 1969. V. 61. P. 121–131.
12. Engberg J. // Europ. J. Cell Biol. 1985. V. 36. P. 133–151.
13. Atwood K.C. // Genetics. 1969. V. 61. P. 319–324.
14. Boncinelli E., Graziani F., Polito L., Malva C. // Cell Diff. 1972. V. 1. P. 133–139.
15. Locker D. // Mol. Gen. Genet. 1976. V. 143. P. 261–272.
16. Ritossa F.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1968. V. 60. P. 509–519.
17. Ritossa F. // The genetics and biology of Drosophila. V. 1b / Eds Ashburner M., Novitski E. London–New York–San Francisco, 1976. P. 801–812.

18. Ritossa F. M., Scala G. // *Genetics*. 1969. V. 61. P. 305–314.
19. Tobler H., Etter A., Müller F. // *Trends Genet*. 1992. V. 8. P. 427–432.
20. Etter A., Aboutanos M., Tobler H., Müller F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991. V. 88. P. 1593–1596.
21. Etter A., Bernard V., Kenzelmann M., Tobler H., Müller F. // *Science*. 1994. V. 265. P. 954–956.
22. Spicher A., Etter A., Bernard V., Tobler H., Müller F. // *Dev Biol*. 1994. V. 164. P. 72–86.
23. Шестаков С.В. // *Палеонтологический журн*. 2003. № 6. С. 50–57.
24. Petrov D.A. // *Trends Genetics*. 2001. V. 17. P. 23–28.
25. Гришанин А.К., Худолий Г.А., Шайхаев З.Г.О., Бродский В.Я., Макаров В.Б., Акифьев А.П. // *Генетика*. 1996. Т. 32. С. 492–499.
26. Загоскин М.В., Гришанин А.К., Королев А.Л., Паленко М.В., Муха Д.В. // *ДАН*. 2008. Т. 423. № 4. С. 551–555.
27. Degtyarev S., Boykova T., Grishanin A., Belyakin S., Rubtsov N., Karamysheva T., Makarevich G., Akifyev A., Zhimulev I. // *Genome Res*. 2004. V. 14. № 11. P. 2287–2294.
28. Drouin G. // *Genome*. 2006. V. 49. P. 657–665.
29. Гришанин А.К. // *Онтогенез*. 1995. Т. 26. С. 188–195.
30. Grishanin A.K., Dams H.-U., Akifiev A.P. // *Zool. Stud*. 2004. V. 43. P. 8–19.
31. Lee Ch., Lee S., Shin S.G., Hwang S. // *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2008. V. 78. № 2. P. 371–376.
32. Li Z., Hansen J.L., Liu Y., Zemetra R.S., Berger P.H. // *Plant Mol. Biol. Rep*. 2004. V. 22. P. 179–188
33. Yuan J.S., Burris J., Stewart N.R., Mentewab A., Stewart C.N., Jr. // *VMC Bioinformatics* 2007. 8(Suppl 7):S6
34. Гришанин А.К., Бойкова Т.В., Маршак Т.Л., Акифьев А.П., Жимулев И.Ф. // *ДАН*. 2006. Т. 408. № 5. С. 684–687.
35. Кафиани К.А., Тимофеева М.Я. // *Докл. АН СССР*. 1964. Т. 154. С. 721–724.
36. Гришанин А.К., Бродский В.Я., Акифьев А.П. // *ДАН*. 1994. Т. 338. С. 708–710.
37. Livak K.J., Schmittgen T.D. // *Methods*. 2001. V. 25. № 4. P. 402–408.
38. Ide S., Miyazaki T., Maki H., Kobayashi T. // *Science*. 2010. V. 327. № 5966. P. 693–696.
39. Каграманова А.С., Капелинская Т.В., Королёв А.Л., Муха Д.В. // *Молекуляр. биология*. 2007. Т. 41. № 4. С. 546–553.
40. Jakubczak J., Zenni M.K., Woodruff R.C., Eickbush T.H. // *Genetics*. 1992. V. 131. P. 129–142.
41. Larson D.E., Zahradka P., Sells B.H. // *Biochem. Cell. Biol*. 1991. V. 69. P. 5–22.
42. Moss T., Stefanovsky V.Y. // *Nucl. Acids Res. Mol. Biol*. 1995. V. 50. P. 25–66.

УДК 575.113.2, 575.167, 616-0.06.482, 616-0.06.484

Ассоциативное исследование генов детоксикации ксенобиотиков и репарации у детей со злокачественными новообразованиями мозга

Л. Е. Сальникова¹, Н. И. Зелинская², О. Б. Белопольская¹, М. М. Асланян³, А. В. Рубанович^{1*}¹Учреждение Российской академии наук Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991, Москва, ул. Губкина, 3²Федеральное государственное учреждение «Российский научный центр рентгенорадиологии Росмедтехнологий», 117997, Москва, ул. Профсоюзная, 86³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, МГУ

*E-mail: rubanovich@vigg.ru

Поступила в редакцию 31.08.2010 г.

РЕФЕРАТ Представлены результаты исследования ассоциации аллелей генов детоксикации ксенобиотиков – *CYP1A1*, *GSTM1*, *GSTM3*, *GSTP1*, *GSTT1*, генов репарации ДНК – *XRCC1*, *XPD*, *OGG1*, гена, ответственного за метилирование ДНК, – *MTHFR* и гена нейрональной синтазы азота – *nNOS* у детей со злокачественными заболеваниями мозга (больные – 172 человека, контроль – 183). Генотипирование осуществляли методом аллель-специфической тетрапраймерной реакции. Увеличение риска заболеваемости сопряжено с минорным вариантом гена *CYP1A1* (606G, $p = 0.009$; OR = 1.50), делеционным вариантом *GSTT1* ($p = 0.013$, OR = 1.96) и достигает максимума у носителей двойных делеций *GSTT1-GSTM1* ($p = 0.017$, OR = 2.42). Полученные результаты обсуждаются в связи с опубликованными данными о предрасположенности к злокачественным новообразованиям головного мозга у детей и взрослых.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА полиморфизм генов, злокачественные новообразования мозга у детей, гены детоксикации ксенобиотиков, гены репарации.

ВВЕДЕНИЕ

Причины развития злокачественных новообразований центральной нервной системы (ЦНС) у детей, из которых 80% составляют опухоли головного мозга, неизвестны. В число факторов риска этой патологии входят наследственная предрасположенность и воздействие ионизирующего излучения. Известны некоторые генетические синдромы, при которых возникают опухоли ЦНС (синдромы Ли-Фраумени и Туркота, нейрофиброматоз, бугорчатый склероз), кроме того есть семьи с повышенной частотой именно опухолей мозга. Например, в популяционной когорте из штата Юта и созданного на ее базе ракового регистра установлена значимость наследственного фактора при наиболее распространенных злокачественных новообразованиях мозга у взрослых: астроцитоммах и глиобластомах [1]. Выполненные на основе ракового

регистра Швеции работы показали, что у родственников первого порядка риск развития опухолей мозга с теми же гистопатологическими характеристиками, что и у пробандов, повышен в 2–3 раза [2]. У потомков больных, перенесших рак мозга в детском возрасте, вероятность возникновения этого заболевания увеличена в 2 раза [3], как и у сибсов больных, особенно в возрасте до 5 лет.

У родственников больных злокачественными новообразованиями мозга может быть повышен риск и других онкологических заболеваний. Среди родственников первого порядка больных глиомой увеличен стандартный показатель заболеваемости (SIR – отношение наблюдаемого числа случаев к ожидаемому) любой онкопатологией (SIR = 1.21), особенно в возрасте до 45 лет (SIR = 5.08). Наиболее часто у родственников больных глиомой регистриру-

ют опухоли мозга (SIR = 2.14), меланомы (SIR = 2.02) и саркомы (SIR = 3.83) [4].

Заболеваемость раком мозга, особенно среди детей в возрасте до 5 лет, выросла в большинстве развитых стран [5]. Вопрос о роли факторов среды в детском канцерогенезе вообще и в риске развития опухолей ЦНС в частности изучается очень активно. Установлена связь между экспозицией *in utero* ионизирующему излучению и риском лейкозов и других опухолей в детском возрасте [6], а также между приемом диэтилстильбэстрола женщинами во время беременности и чистоклеточной аденокарциномой вагины у их дочерей [7]. Показано также, что развитие опухолей мозга у детей ассоциировано с профессиональной вредностью родителей: пестицидами [8] или гербицидами [9]. Есть работы, в которых анализировали влияние материнской диеты на вероятность возникновения рака мозга у детей. Наиболее неблагоприятно в этом отношении высокое содержание нитрозаминов, широко используемых в консервировании мясных и колбасных изделий, а также повышенное содержание жиров [10, 11]. Трансплацентарные канцерогены алкилнитрозомочевины обладают высоким канцерогенным потенциалом в отношении рака мозга у крыс [12]. Риск рака мозга повышен у детей как с недостаточным [13], так и с избыточным весом при рождении [14], увеличенным размером головы (OR = 1.27 на каждый сантиметр прироста окружности головы после стратификации выборки на пол, вес, рост новорожденного) [15], а также у детей, чьи матери имели в анамнезе случаи невынашивания беременности [16]. Интенсивное курение (> 10 сигарет в день) во время беременности также относится к факторам риска онкозаболеваний ЦНС у потомства [13].

При отсутствии наследственных синдромов, связанных с развитием злокачественных новообразований нервной системы, роль генетических факторов риска отводится генам с низкой пенетрантностью [17]. Хотя структура нейроонкологической заболеваемости у взрослых и детей сильно различается [18, 19], изучение именно детей со спорадическими формами рака может позволить выявить генетическую предрасположенность с большей эффективностью, чем у взрослых. Чем выше наследственно обусловленная предрасположенность к раку, тем скорее средовое воздействие даже незначительной выраженности приведет к его развитию.

Несмотря на то что среди солидных опухолей у детей рак мозга встречается наиболее часто, составляя 20% всей онкопатологии, проведено всего несколько ассоциативных исследований опухолей мозга у детей в разных этнических популяциях. Так, в Таиланде в выборке из 73 детей с различными видами опухо-

лей ЦНС показано увеличение числа гомозиготных носителей минорного варианта гена фолатного обмена *MTHFR* (полиморфизм A1298C) [20]. В США изучали распределение аллелей генов детоксикации ксенобиотиков *GSTM1* (инсерция/делеция), *GSTT1* (инсерция/делеция) и *GSTP1* (Ala114Val) среди 173 больных детей и зарегистрировали ассоциацию функционального аллеля *GSTM1* и редкого генотипа *GSTP1* (Val114/Val114) с педиатрическими астроцитомами [21]. В объединенной выборке взрослых (92) и детей (43) с раком мозга той же группой исследователей показано, что распределение частот генотипов Arg72Pro гена *P53* достоверно отличалось у больных и в контрольной группе. Отмечено также увеличение числа гетерозигот по данному полиморфизму гена *P53* среди больных с астроцитомами высокой степени злокачественности [22].

Взаимодействие среды и генотипа в связи с заболеваемостью раком мозга в детском возрасте изучали в двух работах [23, 24]. В условиях экспозиции с фосфорорганическими инсектицидами *in utero* или после рождения повышенный шанс развития злокачественных новообразований мозга достоверно ассоциирован с полиморфизмом гена детоксикации *PON1* (C108T), для которого данные соединения являются субстратом [23]. В продолженном на большей выборке (201 больной) исследовании эффекты *PON1* были подтверждены, а также показана сопряженность еще двух генов детоксикации, участвующих в метаболизме инсектицидов, *FMO1* (C9536A) и *BCHE* (A539T) с риском опухолей мозга [24].

В настоящей работе представлены результаты ассоциативного исследования генетических факторов риска злокачественных новообразований мозга у детей. Выбор локусов для генотипирования основывался на литературных данных и собственных результатах исследования генов предрасположенности к повышенной соматической мутабельности [25]. В исследование были включены также гены, преимущественно экспрессирующиеся в мозге (*GSTM3*, другое название мозговая *GSTM*) и нервной ткани (*NOS1*, или *nNOS* – нейрональная) и продемонстрировавшие сопряженность с некоторыми онкологическими заболеваниями [26, 27]. Описание локусов приведено в табл. 1.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выборка детей со злокачественными опухолями ЦНС составила 172 человека (92 мальчика и 80 девочек) в возрасте от 2 до 16 лет, находившихся на лечении в лаборатории детской рентгенорадиологии ФГУ «РНЦРР Росмедтехнологий» в 2007–2010 годах. Средний возраст больных детей 8.96±0.38. Наиболее распространенные опухоли в изученной когор-

Таблица 1. Исследованные гены и полиморфизмы

Ген	Название	Полиморфизм	Идентификатор в базе данных dbSNP	Локус	Функции
Ген цитохрома P-450 1A1	CYP1A1	T606G	rs2606345	15q24.1	1-я фаза детоксикации ксенобиотиков – метаболическая активация ароматических углеводов
		A4889G Ile462Val	rs1048943		
Ген глутатион-S-трансферазы μ 1	GSTM1	Инсерция-делеция	-	1p13.3	2-я фаза детоксикации ксенобиотиков – собственно детоксикация путем присоединения восстановленного глутатиона к гидрофобным электрофильным соединениям
Ген глутатион-S-трансферазы θ 1	GSTT1	Инсерция-делеция	-	22q11.2	
Ген глутатион-S-трансферазы μ 3	GSTM3	G670A Val224Ile	rs7483	1p13.3	
Ген глутатион-S-трансферазы π 1	GSTP1	A313G Ile105Val	rs1695	11q13	
Ген репарации комплементарных повреждений ДНК в результате рентгеновского излучения у китайских хомячков-1	XRCC1	C589T Arg194Trp	rs1799782	19q13.2	Экцизионная репарация оснований
Ген эксцизионной репарации комплементарных повреждений ДНК у китайских хомячков-2	ERCC2 (XPD)	T2251G Lys751Gln	rs13181	19q13.3	Экцизионная репарация нуклеотидов
		G862A Asp312Asn	rs1799793		
Ген 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы	OGG1	C977G Ser326Cys	rs1052133	3p26.2	Экцизионная репарация оснований – удаление 8-оксо-7,8-дигидро-2'-дезоксигуанозина
Ген нейрональной NO-синтазы	nNOS (NOS1)	C276T	rs2682826	12q24.2	Производство оксида азота в нервных тканях
Ген метилентетрагидрофолатредуктазы	MTHFR	C677T Ala222Val	rs1801133	1p36.3	Превращение 5,10-метилентетрагидрофолата в 5-метилтетрагидрофолат – кофактор при деметилировании метионина в гомоцистеин

те – это медуллобластома ($N = 58$) и опухоли ствола мозга ($N = 26$). Помимо этого были представлены анапластическая эпендимома ($N = 19$), глиобластома ($N = 10$), герминогенные опухоли ($N = 6$), астроцитома низкой степени злокачественности ($N = 5$), астроцитома высокой степени злокачественности ($N = 5$), примитивные нейроэктодермальные опухоли ($N = 5$), остальные ($N = 38$). Контрольная группа состояла из 183 человек (102 мужчин и 81 женщина) в возрасте от 17 до 21 года, средний возраст 19.90 ± 0.08 лет. Все больные дети и лица из контрольной выборки относятся к европеоидной расе. База данных для больных содержит информацию о месте рождения и проживания. От родителей больных детей получено информированное согласие на генотипирование. Десятилетняя разница в среднем возрасте у больных и здоровых не могла существенно сказаться на различиях в частотах аллельных вариантов ге-

нов в группах, так как уровень смертности в диапазоне данных возрастов не превышает 0.1% (табл. 2) [28]. Кроме того, в группе 15–24 года первые четыре места причин смерти занимают различные виды насильственной смерти: неумышленные повреждения, самоубийства, повреждения без уточнения и убийства [29]. Критерии для включения в контрольную группу – возраст, национальность, рождение в Центральном регионе Европейской территории России и наличие информированного согласия.

ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови с помощью наборов Diatom DNA Prep 200, основанных на использовании гуанидинтиоцианата и Nucleus-сорбента (Лаборатория Изоген, Россия). Генотипирование осуществляли с использованием аллель-специфической тетрапраймерной ПЦР [30]. Метод позволяет в одной пробирке амплифицировать фрагменты ДНК, соответствующие альтерна-

Таблица 2. Показатели смертности населения России в возрасте до 24 лет

Возраст, лет	Умершие на 1000 человек населения		
	2006 год	2007 год	2008 год
0	10.2	9.4	8.5
1–4	0.7	0.6	0.6
5–9	0.4	0.3	0.3
10–14	0.4	0.4	0.3
15–19	1.1	1.1	1.1
20–24	2.2	2.1	1.9

тивным аллелям. Продукты амплификации разделяли при помощи электрофореза в агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием.

Статистический анализ проводили стандартными методами с помощью пакета WinSTAT 2003.1, интегрированного в Excel.

При оценке отношения шансов (OR) и значимости отличий частот по точному критерию Фишера использовали свободно распространяемый пакет программ WinPepi: <http://www.brixtonhealth.com/pepi4windows.html>.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Определены генотипы обследованных индивидов по 12 полиморфным сайтам 10 генов. Частоты генотипов в контрольной группе и в группе больных соответствуют равновесному распределению по Харди-Вайнбергу.

В табл. 3 сопоставлены частоты встречаемости аллелей и генотипов (табл. 3) 12 полиморфных сайтов у детей с различными опухолями центральной нервной системы и в контрольной группе. В когорте больных детей были выделены две наиболее многочисленные группы: с медуллобластомами и опухолями ствола мозга.

В случае инсерционно-делеционного полиморфизма (гены *GSTM1*, *GSTT1*) сравнивали два варианта генотипа: «нулевой» – гомозиготная делеция (D/D) и «функциональный» – несущий функциональный аллель в гомо- или гетерозиготном состоянии (I/*). Здесь и далее * означает произвольный аллель.

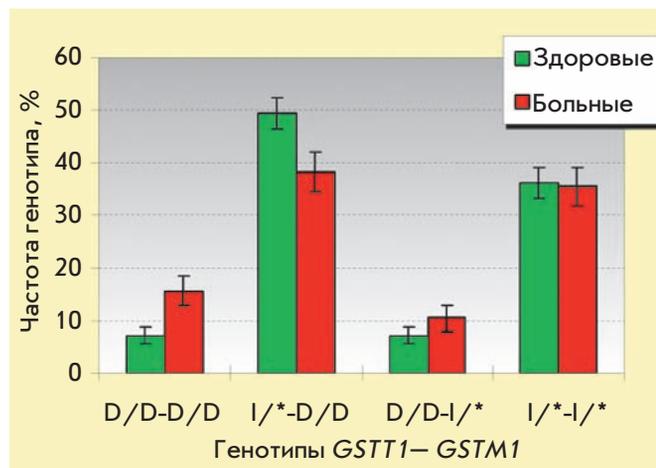
Повышенная предрасположенность к развитию рака мозга обнаружена у носителей генотипа D/D гена *GSTT1*. По двустороннему критерию Фишера для всех разновидностей опухолей ЦНС $p = 0.013$, OR = 1.96, 95% доверительный интервал 1.16–3.32;

для больных медуллобластомой $p = 0.009$, OR = 2.57, 95% доверительный интервал 1.33–4.99; для детей с опухолями ствола мозга $p = 0.026$, OR = 2.93, 95% доверительный интервал 1.21–7.12. Среди всех проверенных комбинаций двулокусных сочетаний наиболее высокий шанс развития злокачественных опухолей мозга оказался у носителей двойных делеций *GSTM1-GSTT1* (27 человек – 15.7% больных; $p = 0.017$, OR = 2.42, 95% доверительный интервал 1.18–4.95) (рисунки).

Риск развития всех опухолей мозга и, в частности, медуллобластомы оказался выше у носителей минорного аллеля 606G гена *CYP1A1* (для всех опухолей $p = 0.009$ согласно двустороннему критерию Фишера, OR = 1.50, 95% доверительный интервал 1.11–2.03, для медуллобластомы $p = 0.026$, OR = 1.60, 95% доверительный интервал 1.06–2.41).

Среди больных с опухолями ствола мозга повышено количество носителей минорного аллеля *NOS1*276T* в гомо- или гетерозиготном состоянии, $p = 0.035$, OR = 2.56, 95% доверительный интервал 1.10–5.96. Во всей группе больных также увеличена частота встречаемости минорного варианта, но данные статистически незначимы $p = 0.11$, OR = 1.42, 95% доверительный интервал 0.93–2.16.

На уровне тенденции зафиксирована также ассоциация минорного аллеля 2251G гена эксцизионной репарации нуклеотидов *XPB* в гомо- или гетерозиготном состоянии с увеличенным шансом развития опухолей мозга ($p = 0.084$, OR = 1.48, 95% доверительный интервал 0.97–2.27).



Встречаемость сочетанных вариантов аллелей генов *GSTT1-GSTM1* среди больных со злокачественными новообразованиями головного мозга и в контрольной выборке.

Таблица 3. Частоты генотипов в группе больных с опухолями ЦНС и в контрольной выборке

Локусы, аллели и генотипы		Число случаев, %			
		Все опухоли мозга (N* = 172)	Медуллобластома (N* = 63)	Опухоли ствола мозга (N* = 26)	Контроль (N* = 183)
CYP1A1 T606G rs2606345	T	187 (54.68)	67 (53.18)	30 (57.69)	236 (64.48)
	G	155 (45.32)	59 (46.83)	22 (42.31)	130 (35.52)
	T/T	57 (33.33)	22 (34.92)	10 (38.46)	78 (42.62)
	T/G	73 (42.69)	23 (36.51)	10 (38.46)	80 (43.72)
	G/G	41 (23.98)	18 (28.57)	6 (23.08)	25 (13.66)
CYP1A1 A4889G rs1048943	A	329 (95.64)	120 (95.24)	49 (94.23)	352 (96.18)
	G	15 (4.36)	6 (4.76)	3 (5.77)	14 (3.83)
	A/A	157 (91.28)	57 (90.48)	23 (88.46)	169 (92.35)
	A/G	15 (8.72)	6 (9.52)	3 (11.54)	14 (7.65)
	G/G	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
GSTM1	D/D	93 (54.07)	35 (55.56)	16 (61.54)	95 (51.91)
	I/*	79 (45.93)	28 (44.44)	10 (38.46)	88 (48.09)
GSTT1	D/D	45 (26.16)	20 (31.75)	9 (34.62)	28 (15.30)
	I/I*	127 (73.84)	43 (68.25)	17 (65.38)	155 (84.70)
GSTP1 A313G rs1695	A	242 (70.35)	87 (69.05)	31 (62.00)	247 (67.49)
	G	102 (29.65)	39 (30.95)	19 (38.00)	119 (32.51)
	A/A	80 (46.51)	29 (46.03)	8 (32.00)	79 (43.17)
	A/G	82 (47.67)	29 (46.03)	15 (60.00)	89 (48.63)
	G/G	10 (5.81)	5 (7.94)	2 (8.00)	15 (8.20)
GSTM3 G670A rs7483	G	203 (59.01)	80 (63.49)	28 (53.85)	222 (60.66)
	A	141 (40.99)	46 (36.51)	24 (46.15)	144 (39.34)
	G/G	63 (36.63)	26 (41.27)	8 (30.77)	73 (39.89)
	G/A	77 (44.77)	28 (44.44)	12 (46.15)	76 (41.53)
	A/A	32 (18.60)	9 (14.29)	6 (23.08)	34 (18.58)
NOS1 C276T rs2682826	C	243 (70.64)	90 (71.43)	33 (63.46)	271 (75.70)
	T	101 (29.36)	36 (28.57)	19 (36.54)	87 (24.30)
	C/C	84 (48.84)	33 (52.38)	9 (34.62)	103 (57.54)
	C/T	75 (43.60)	24 (38.10)	15 (57.69)	65 (36.31)
	T/T	13 (7.56)	6 (9.52)	2 (7.69)	11 (6.15)
MTHFR C677T rs1801133	C	228 (70.81)	76 (66.67)	36 (72.00)	221 (67.79)
	T	94 (29.19)	38 (33.33)	14 (28.00)	105 (32.21)
	C/C	80 (49.69)	25 (43.86)	13 (52.00)	70 (42.94)
	C/T	68 (42.24)	26 (45.61)	10 (40.00)	81 (49.69)
	T/T	13 (8.07)	6 (10.53)	2 (8.00)	12 (7.36)
XRCC1 C589T rs1799782	C	322 (93.61)	119 (94.44)	46 (88.46)	337 (94.13)
	T	22 (6.40)	7 (5.56)	6 (11.54)	21 (5.87)
	C/C	150 (87.21)	56 (88.89)	20 (76.92)	160 (89.39)
	C/T	22 (12.79)	7 (11.11)	6 (23.08)	17 (9.50)
	T/T	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	2 (1.12)
XPD T2251G rs13181	T	212 (61.63)	82 (65.08)	32 (61.54)	248 (68.13)
	G	132 (38.37)	44 (34.92)	20 (38.46)	116 (31.87)
	T/T	63 (36.63)	25 (39.68)	9 (34.62)	84 (46.15)
	T/G	86 (50.00)	32 (50.79)	14 (53.85)	80 (43.96)
	G/G	23 (13.37)	6 (9.52)	3 (11.54)	18 (9.89)
XPD G862A rs1799793	G	211 (61.70)	82 (66.13)	32 (61.54)	242 (66.48)
	A	131 (38.30)	42 (33.87)	20 (38.46)	122 (33.52)
	G/G	64 (37.43)	26 (41.94)	9 (34.62)	80 (43.96)
	G/A	83 (48.54)	30 (48.39)	13 (50.00)	82 (45.05)
	A/A	24 (14.04)	6 (9.68)	4 (15.38)	20 (10.99)
OGG1 C977G rs1052133	C	274 (80.59)	92 (77.97)	40 (76.92)	270 (78.04)
	G	66 (19.41)	26 (22.03)	12 (23.08)	76 (21.97)
	C/C	116 (68.24)	36 (61.02)	18 (69.23)	105 (60.69)
	C/G	42 (24.71)	20 (33.90)	4 (15.38)	60 (34.68)
	G/G	12 (7.06)	3 (5.08)	4 (15.38)	8 (4.62)

*Число лиц, генотипированных по отдельным локусам, может несколько отличаться.

Примечание. Серая заливка – генотипы, ассоциированные с заболеваниями.

ОБСУЖДЕНИЕ

Система детоксикации ксенобиотиков состоит из двух основных стадий детоксикации и третьей стадии – выведения образовавшихся нетоксичных продуктов из клетки. На 1-й стадии происходит активация соединений посредством цитохромов P-450 и ряда других ферментов, на 2-й фазе – собственно детоксикация с участием глутатион-S-трансфераз и других белков. Образующиеся на 1-й стадии промежуточные электрофильные метаболиты обладают токсическими свойствами. Для эффективной детоксикации необходим баланс в работе ферментов 1 и 2 стадий, который нарушается как при меньшей каталитической активности ряда полиморфных вариантов ферментов 2-й фазы детоксикации, так и при большей активности ферментов 1-й фазы [31]. Увеличенная активность ферментов первой фазы детоксикации и недостаточность ферментов второй стадии (GST) вызывает повышение содержания в организме промежуточных электрофильных метаболитов, усиливая, таким образом, неблагоприятное воздействие.

В настоящей работе выявлена ассоциация определенных аллелей генов детоксикации ксенобиотиков с развитием опухолей мозга у детей. Риск развития злокачественных новообразований мозга в детском возрасте повышен у носителей минорного варианта *CYP1A1* (606G).

Роль полиморфизма гена *CYP1A1* в детской нейронеоплазии не изучалась. В ассоциативных исследованиях у взрослых показано отсутствие ассоциации полиморфизма *CYP1A1* A4889G (Ile462Val) с риском глиомы и некоторых других злокачественных новообразований мозга [32–34]. Ген *CYP1A1* располагается на участке 15q22–24, а при наследственной предрасположенности к глиоме показана сопряженность заболевания с низкопенетрантными маркерами участка 15q23–q26.3, перекрывающими указанный локус [35].

Данные о роли полиморфизма гена *CYP1A1* в канцерогенезе противоречивы, и, по-видимому, эта роль в значительной степени определяется взаимодействием «генотип-среда» [36]. Сайт T606G находится в первом интроне локуса *CYP1A1*. Однонуклеотидные замены (SNP), которые локализируются в интронных областях, чаще всего никак не влияют на активность гена. Однако для полиморфизма T606G показаны ассоциации с раком легких [37], гормонально-зависимыми опухолями [38], с концентрацией метаболитов половых гормонов, служащих субстратами для *CYP1A1* [39]. Про сайт T606G известно, что в отсутствие специфических субстратов активнее экспрессируется аллельный вариант 606T (SNP T606G) гена *CYP1A1*, а вариант 606G обладает большей индуцибельностью в присутствии специ-

ческих субстратов (полициклические ароматические углеводороды как экзогенного, например пищевые продукты, промышленные загрязнения, табачный дым, так и эндогенного происхождения, например эстрогены). Разнонаправленность влияния аллельных вариантов 606G и 606T на регистрируемые эффекты в экологически неблагоприятных условиях (промышленное загрязнение воздуха, курение) и в их отсутствие показана в двух независимых исследованиях [40, 41]. Два сайта в локусе *CYP1A1*, изученные в настоящей работе, тесно сцеплены: $D' = 0.913$, $r = 0.229$, $p = 0$, а минорные аллели (4889G, 606G) относятся к одной группе сцепления. Показатели неравновесия по сцеплению не отличаются в группе больных и в контроле. В представленной работе мы подтвердили полученные нами ранее на других выборках результаты по сцеплению полиморфных сайтов A4889G и T606G [25, 42]. По данным Нар-Мар у европеоидов частота аллеля 606G составляет 0.36–0.45, а аллеля 4889G – 0.04–0.07. До недавнего времени в европейских популяциях изучали три основных полиморфных сайта гена *CYP1A1*: T3801C, A4889G и C4887A [43]. Кроме того что полиморфизм T606G имеет функциональный характер, частота аллеля 606G выше, чем встречаемость минорных вариантов других полиморфных сайтов. Таким образом, этот аллель представляется новым перспективным маркером для ассоциативных исследований многофакторных заболеваний.

В исследовании также зарегистрированы ассоциации со злокачественными новообразованиями мозга у носителей делеционных вариантов *GSTT1* (D/D) (OR=1.96, $p = 0.013$). Сопряженность полиморфизма генов, кодирующих глутатион-S-трансферазы, ферменты второй стадии детоксикации ксенобиотиков, с развитием опухолей мозга у детей анализировали в работе [21]. Достоверные результаты получены для функционального аллеля *GSTM1* и минорного варианта *GSTP1* 313G. Ассоциацию между развитием злокачественных новообразований мозга у взрослых и полиморфизмом генов глутатион-S-трансфераз анализировали значительно чаще, например, таким исследованиям в европейских странах посвящены 10 публикаций [32–34, 44–50]. Результаты семи из них и уже указанной работы, выполненной на выборке больных детей [21], объединены в мета-анализе [51], проведенном для двух наиболее частых нозологических форм: глиомы и менингиомы. Согласно этому мета-анализу, у европеоидов делеционный вариант *GSTT1* достоверно чаще встречался у больных менингиомой (OR = 1.95). Для генов *GSTM1* (Ins/Del) и *GSTP1* A313G (Ile105Val) и соседнего с ним C341T (Ala114Val) различия по частотам аллелей между больными и здоровыми не выявлены. Еще в одном

масштабном исследовании получены данные об отсутствии сопряженности полиморфизма генов *GSTM1* (Ins/Del), *GSTM3* (A63C), *GSTT1* (Ins/Del) с развитием глиом, глиобластом и менингиом. Показано, что гаплотип 105G-114C (Val-Ala) гена *GSTP1* обладает слабым протективным эффектом относительно шанса заболеть глиомой [32].

По генам репарации значимые различия между частотами аллелей у больных и в контроле не выявлены (табл. 3), однако по локусу *XPB* на уровне тенденции зафиксирована сопряженность минорного аллеля 2251G с увеличенным шансом заболеваемости.

В ассоциативные исследования злокачественных новообразований любой локализации в связи с полиморфизмом генов репарации наиболее часто, среди всего многообразия этой группы генов, включают гены эксцизионной репарации нуклеотидов *XPB* и эксцизионной репарации оснований *XRCC1* [52], которые находятся на одном участке хромосомы 19q13.2-3. Основные результаты ассоциативных исследований опухолей мозга собраны в обзоре [53]. Показано, что у взрослых наиболее распространенные злокачественные опухоли нейроэпителиальной ткани ассоциированы с полиморфизмом генов эксцизионной репарации нуклеотидов *XPB*, *ERCC1* и расположенного на том же участке хромосомы 19q13.2-3 гена *GLTSCR1* (glioma tumor suppressor candidate of unknown function) [54]. В работе Caggana и соавт. [55] показано, что из семи полиморфных сайтов гена *XPB* максимальная сопряженность с риском развития глиомы получена для малоизученного синонимичного полиморфизма Arg156Arg, возможно, являющегося маркером другого неизвестного гена предрасположенности к данному заболеванию. Сайты T2251G (Lys751Gln) и G862A (Asp312Asn) гена *XPB* разделены 12340 п.н. и сцеплены друг с другом. В данной работе для них получены следующие показатели неравновесия по сцеплению: $D' = 0.674$, $r = 0.662$, $p = 0$ (не отличаются у больных и здоровых), что коррелирует с опубликованными данными для европеоидов [56]. Несмотря на отсутствие в нашем исследовании значимых результатов по генам репарации, изучение полиморфизма локусов, расположенных на участке хромосомы 19q13.2-3, представляется нам перспективным направлением поиска генетических маркеров риска развития злокачественных новообразований мозга у детей.

В данной работе также показано, что минорный аллель гена нейрональной синтазы азота достоверно чаще встречался среди больных с опухолями ствола мозга (табл. 3); для всей группы больных различия не достигают значимого уровня.

Гены семейства синтаз азота, к которым относится нейрональная синтаза азота, чаще изучают в связи

с воспалительными процессами в организме. Однако полиморфизм *nNOS* сопряжен с предрасположенностью к меланоме [27]. Меланома относится к группе опухолей нервных окончаний. В семьях с наследственной предрасположенностью к опухолям мозга увеличен также риск развития меланомы [5]. Учитывая повышенную экспрессию *nNOS* именно в нервной ткани, а также предполагаемую перекрестную чувствительность к меланоме и глиомам, мы анализировали также сайт C276T гена *nNOS*. Этот полиморфизм относится к функциональным, так как в связи с однонуклеотидной заменой в нетранслируемом участке увеличивается экспрессия мРНК у минорного варианта [57]. Достоверные результаты о сопряженности минорного аллеля с повышенным шансом заболевания злокачественными новообразованиями мозга получены только относительно немногочисленной группы больных с опухолями ствола мозга и, безусловно, требуют проверки.

В наших предыдущих ассоциативных исследованиях генов детоксикации ксенобиотиков показано, что у женщин с заболеваниями репродуктивной сферы, носительниц аллелей 606G, 4889G гена *CYP1A1* повышена частота соматических генных мутаций по локусу Т-клеточного рецептора (TCR) в лимфоцитах периферической крови (фенотип CD³-CD⁴⁺). Известно, что число таких TCR-мутантных лимфоцитов увеличено у раковых больных (рак гортани и гортаноглотки, рак щитовидной железы, рак шейки матки, лимфома Ходжкина) и у лиц с наследственной предрасположенностью к возникновению онкологических заболеваний (атаксия-телеангиэктазия) [58, 59]. Однонаправленность эффектов в двух различных исследованиях может отражать плеiotропное действие генов детоксикации, приводящее к недостаточной устойчивости организма во взаимодействии генотип-среда. Кроме возможного увеличения риска заболевания в связи с изменением активности ферментов детоксикации, аллельные варианты генов, ассоциированных и с соматической мутабельностью, и с предрасположенностью к развитию злокачественных новообразований мозга у детей, могут служить маркерами блока сцепления, отражающими эффекты других, пока неизвестных, генов. Полученные результаты, при подтверждении их независимыми исследованиями, могут быть полезны для выявления генетических факторов риска развития злокачественных новообразований мозга у детей. ●

Работа финансирована в рамках Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Биологическое разнообразие», подпрограмма «Генофонды и генетическое разнообразие».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Blumenthal D.T., Cannon-Albright L.A. // *Neurology*. 2008. V. 71. P. 1015–1020.
2. Malmer B., Henriksson R., Grönberg H. // *Int. J. Cancer*. 2003. V. 106. № 2. P. 260–263.
3. Sankila R., Olsen J.H., Anderson H., Garwicz S., Glatte E., Hertz H., Langmark F., Lanning M., Møller T., Tulinius H. // *N. Engl. J. Med.* 1998. V. 338. № 13. P. 1339–1344.
4. Scheurer M.E., Etzel C.J., Liu M., El-Zein R., Airewele G.E., Malmer B., Aldape K.D., Weinberg J.S., Yung W.K., Bondy M.L. // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2007. V. 16. № 11. P. 2491–2495.
5. Hemminki K., Li X., Vaittinen P., Dong C. // *Br. J. Cancer*. 2000. V. 83. № 3. P. 407–411.
6. Busby C.C. // *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2009. V. 6. № 12. P. 3105–3114.
7. Herbst A.L., Ulfelder H., Poskanzer D.C. // *N. Engl. J. Med.* 1971. V. 284. P. 878–881.
8. Bassil K.L., Vakil C., Sanborn M., Cole D.C., Kaur J.S., Kerr K.J. // *Can. Fam. Physician*. 2007. V. 53. № 10. P. 1704–1711.
9. Shim Y.K., Mlynarek S.P., van Wijngaarden E. // *Environ. Health Perspect.* 2009. V. 117. № 6. P. 1002–1006.
10. Dietrich M., Block G., Pogoda J.M., Buffler P., Hecht S., Preston-Martin S. // *Cancer Causes & Control*. 2005. V. 16. № 6. P. 619–635.
11. Pogoda J.M., Preston-Martin S., Howe G., Lubin F., Mueller B.A., Holly E.A., Filippini G., Peris-Bonet R., McCreddie M.R.E., Cordier S., Choi W. // *Ann. Epidemiol.* 2009. V. 19. № 3. P. 148–160.
12. Idowu O.E., Idowu M.A. // *Afr. Health Sci.* 2008. V. 8. № 1. P. 1–4.
13. Schüz J., Kaletsch U., Kaatsch P., Meinert R., Michaelis J. // *Med. Pediatr. Oncol.* 2001. V. 36. № 2. P. 274–282.
14. Harder T., Plagemann A., Harder A. // *Am. J. Epidemiol.* 2008. V. 168. № 4. P. 366–373.
15. Samuelsen S.O., Bakketeig L.S., Tretli S., Johannesen T.B., Magnus P. // *Lancet Oncol.* 2006. V. 7. № 1. P. 39–42.
16. Cantwell M.M., Forman M.R., Middleton R.J., Murray L.J. // *Br. J. Cancer*. 2008. V. 99. № 5. P. 796–799.
17. de Andrade M., Barnholtz J.S., Amos C.I., Adatto P., Spencer C., Bondy M.L. // *Genet. Epidemiol.* 2001. V. 20. № 2. P. 258–270.
18. Merchant T.E., Pollack I.F., Loeffler J.S. // *Semin. Radiat. Oncol.* 2010. V. 20. № 1. P. 58–66.
19. Arora R.S., Alston R.D., Eden T.O.B., Estlin E.J., Moran A., Birch J.M. // *Neuro-Oncology*. 2009. V. 11. № 4. P. 403–413.
20. Sirachainan N., Wongruangsri S., Kajanachumpol S., Pakakasama S., Visudtibhan A., Nuchprayoon I., Lusawat A., Phudhicharoenrat S., Shuangshoti S., Hongeng S. // *Cancer Detect. Prev.* 2008. V. 32. № 1. P. 72–78.
21. Ezer R., Alonso M., Pereira E., Kim M., Allen J.C., Miller D.C., Newcomb E.W. // *J. Neurooncology*. 2002. V. 59. № 2. P. 123–134.
22. Parhar P., Ezer R., Shao Y., Allen J.C., Miller D.C., Newcomb E.W. // *Brain Res. Mol. Brain Res.* 2005. V. 137. № 1–2. P. 98–103.
23. Nielsen S.S., Mueller B.A., De Roos A.J., Viernes H.-M.A., Farin F.M., Checkoway H. // *Environ. Health Perspect.* 2005. V. 113. № 7. P. 909–913.
24. Nielsen S.S., McKean-Cowdin R., Farin F.M., Holly E.A., Preston-Martin S., Mueller B.A. // *Environ. Health Perspect.* 2010. V. 118. № 1. P. 144–149.
25. Сальникова Л.Е., Замулаева И.А., Белопольская О.Е., Иванова Т.И., Кузнецова Г.И., Саенко А.С., Абилев С.К., Рубанович А.В. // *Экологическая генетика*. 2010. Т. 8. № 2. С. 18–23.
26. De Roos A.J., Rothman N., Brown M., Bell D.A., Pittman G.S., Shapiro W.R., Selker R.G., Fine H.A., Black P.M., Inskip P.D. // *Neuro-Oncology*. 2006. V. 8. № 2. P. 145–155.
27. Li C., Hu Z., Liu Z., Wang L.-E., Gershenwald J.E., Lee J.E., Prieto V.G., Duvic M., Grimm E.A., Wei Q. // *Cancer*. 2007. V. 109. № 8. P. 1570–1578.
28. Демографический ежегодник России. 2009. Статистический сборник. М.: Росстат, 2009. 557 с.
29. Демоскоп. Weekly. Электронная версия бюллетеня Население и общество. Смертность от внешних причин и возраст. 2001. № 29–30. URL: <http://www.demoscope.ru/weekly/029/tema04.php>
30. Hamajima N. // *Exp. Rev. Mol. Diagnosis*. 2001. V. 1. № 1. P. 119–123.
31. Баранов В.С., Баранова Е.В., Иващенко Т.Э., Асеев М.В. Геном человека и гены предрасположенности. Введение в предиктивную медицину. СПб.: Интермедика, 2000. 272 с.
32. Trizna Z., de Andrade M., Kyritsis A.P., Briggs K., Levin V.A., Bruner J.M., Wei Q., Bondy M.L. // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1998. V. 7. P. 553–555.
33. Schwartzbaum J.A., Ahlbom A., Lönn S., Warholm M., Rannug A., Auvinen A., Christensen H.C., Henriksson R., Christoffer Johansen C., Lindholm C., Malmer B., Salminen T., Schoemaker M.J., Swerdlow A.J., Feychting M. // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2007. V. 16. № 3. P. 559–565.
34. De Roos A.J., Rothman N., Inskip P.D., Linet M.S., Shapiro W.R., Selker R.G., Fine H.A., Black P.M., Pittman G.S., Bell D.A. // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2003. V. 12. № 1. P. 14–22.
35. Paunu N., Lahermo P., Onkamo P., Ollikainen V., Rantala I., Helén P., Simola K.O. J., Kere J., Haapasalo H. // *Cancer Res.* 2002. V. 62. P. 3798–3802.
36. Androusoopoulos V.P., Tsatsakis A.M., Spandidos D.A. // *BMC Cancer*. 2009. 9:187. URL: <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/9/187>
37. Rotunno M., Yu K., Lubin J.H., Consonni D., Pesatori A.C., Goldstein A.M., Goldin L.R., Wacholder S., Welch R., Burdette L., Chanock S.J., Bertazzi P.A., Tucker M.A., Caporaso N.E., Chatterjee N., Bergen A.W., Landi M.T. // *PLOS*. 2009. V. 4. № 5. e5652. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2682568>
38. Figueroa J.D., Sakoda L.C., Graubard B.I., Chanock S., Rubertone M.V., Erickson R.L., McGlynn K.A. // *Cancer Causes & Control*. 2008. V. 19. № 9. P. 917–929.
39. Sowers M.R., Wilson A.L., Kardia S.R., Chu J., McConnell D.S. // *Am. J. Med.* 2006. V. 119. № 9. Suppl 1. S44–51. URL: <http://www.amjmed.com/article/S0002-9343%2806%2900828-X/pdf>
40. Wang S., Chanock S., Tang D., Zhigang L., Jedrychowski W., Perera F.P. // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2008. V. 17. № 2. P. 405–413.
41. Lam T.K., Rotunno M., Lubin J.H., Wacholder S., Consonni D., Pesatori A.C., Bertazzi P.A., Chanock S.J., Burdette L., Goldstein A.M., Tucker M.A., Caporaso N.E., Subar A.F., Landi M.T. // *Carcinogenesis*. 2010. V. 31. № 4. P. 634–642.
42. Сальникова Л.Е., Смелая Т.В., Мороз В.В., Голубев А.М., Лаптева Н.Ш., Рубанович А.В. // *Общая реаниматология*. 2010. Т. 6. № 1. С. 5–10.
43. Georgiadis P., Topinka J., Vlachodimitropoulos D., Stoikidou M., Gioka M., Stephanou G., Autrup H., Demopoulos N.A., Katsouyanni K., Sram R., Kyrtopoulos S.A. // *Carcinogenesis*. 2005. V. 26. № 1. P. 93–101.
44. Pinarbasi H., Silig Y., Gurelik M. // *Cancer Genet. Cytogenet.* 2005. V. 156. P. 144–149.

45. Wrensch M., Kelsey K.T., Liu M., Miike R., Moghadassi M., Aldape K., McMillan A., Wiencke J.K. // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2004. V. 13. P. 461–467.
46. Butler M.A., Ruder A.M., Daly A.K., Waters M.A., Carreón T., Schulte P.A. // *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 2003. V. 44. P. 128.
47. Кондратьева Т.В., Имянитов Е.Н., Того А.В., Зайцева О.А., Яцук О.С., Берснев В.П., Хансон К.П. // *Вопросы онкологии.* 1999. Т. 45. С. 523–527.
48. Elexpuru-Camiruaga J., Buxton N., Kandula V., Dias P.S., Campbell D., McIntosh J., Broome J., Jones P., Inskip A., Alldersea J., Fryer A.A., Strange R.C. // *Cancer Res.* 1995. V. 55. № 19. P. 4237–4239.
49. Kelsey K.T., Wrensch M., Zuo Z.F., Miike R., Wiencke J.K. // *Pharmacogenetics.* 1997. V. 7. P. 463–468.
50. Wiencke J.K., Wrensch M.R., Miike R., Zuo Z., Kelsey K.T. // *Carcinogenesis.* 1997. V. 18. P. 1431–1433.
51. Lai R., Crevier L., Thabane L. // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2005. V. 14. № 7. P. 1784–1790.
52. Vineis P., Manuguerra M., Kavvoura F.K., Guarrera S., Allione A., Rosa F., Di Gregorio A., Polidoro S., Saletta F., John P.A., Ioannidis J.P.A., Giuseppe Matullo G. // *J. Natl. Cancer Inst.* 2009. V. 101. № 1. P. 24–36.
53. Bethke L., Webb E., Murray A., Schoemaker M., Johansen C., Christensen H.C., Muir K., McKinney P., Hepworth S., Dimitropoulou P., Lophatananon A., Feychting M., Lönn S., Ahlbom A., Malmer B., Henriksson R., Auvinen A., Kiuru A., Salminen T., Swerdlow A., Houlston R. // *Human Mol. Genet.* 2008. V. 17. № 6. P. 800–805.
54. Yang P., Kollmeyer T.M., Buckner K., Bamlet W., Ballman K.V., Jenkins R.B. // *Cancer.* 2005. V. 103. № 11. P. 2363–2372.
55. Caggana M., Kilgallen J., Conroy J.M., Wiencke J.K., Kelsey K.T., Miike R., Chen P., Wrensch M.R. // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2001. V. 10. P. 355–360.
56. Butkiewicz D., Rusin M., Enewold L., Shields P.G., Chorazy M., Harris C.C. // *Carcinogenesis.* 2001. V. 22. № 4. P. 593–597.
57. Venturelli E., Villa A., Scarpini E., Fenoglio C., Guidi I., Lovati C., Marcone A., Cortini F., Scalabrini D., Clerici F., Bresolin N., Mariani C., Cappa S., Galimberti D. // *Eur. J. Neurol.* 2008. V. 15. № 1. P. 77–81.
58. Замулаева И.А., Саенко А.С., Орлова Н.В., Смирнова С.Г., Цыб А.Ф. Пособие для врачей. Обнинск, 2007. 19 с.
59. Kyoizumi S., Akiyama M., Hirai Y., Kusunoki Y., Tanabe K., Umeki S. // *J. Exp. Med.* 1990. V. 171. № 6. P. 1981–1999.

УДК 577.322.5

Моделирование полноразмерной структуры шаперона Hsp70 человека и изучение его междоменных взаимодействий

К. А. Черноризов¹, В. К. Швядас^{1,2*}¹Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, МГУ, 1, стр. 73²Государственное учреждение Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, МГУ, 1, стр. 73

*E-mail: vyfas@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 02.11.2010 г.

РЕФЕРАТ Hsp70 – белок из класса шаперонов, принимающий участие в сворачивании *de novo* синтезированных белковых молекул, в защите гидрофобных участков денатурировавшихся белков, а также в регуляции апоптоза, иммунного ответа и ряда других клеточных процессов. Несмотря на большое количество работ, посвященных функционированию и структуре Hsp70, достоверная полноразмерная структура этого белка неизвестна. На основании структуры отдельных доменов Hsp70 различных организмов и их элементов при помощи методов молекулярного моделирования сконструированы несколько возможных вариантов полноразмерного Hsp70 человека. Стабильность этих структур изучена с помощью метода молекулярной динамики. В результате проведенного анализа отобрана наиболее адекватная модель, построенная на основании элементов Hsp70 быка (*Bos taurus*) и нематоды (*Caenorhabditis elegans*). С помощью метода управляемой молекулярной динамики выявлены ключевые солевые мостики, связывающие домены друг с другом: Arg171 : Glu516 и Arg416 : Glu218. Предложена схема механизма, запускающего гидролиз АТФ и приводящего к расхождению АТФ-азного и субстратсвязывающего доменов Hsp70.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА шаперон, Hsp70, модель, третичная структура, АТФ-азный домен, субстратсвязывающий домен, молекулярная динамика.

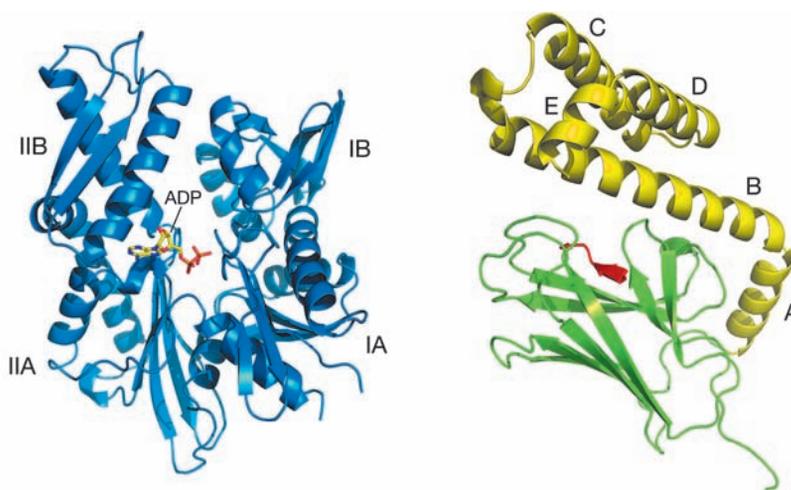
ВВЕДЕНИЕ

Hsp70 (Heat shock 70 kDa protein 1A/1B) – двудоменный АТФ-зависимый белок из класса шаперонов, защищающий гидрофобные поверхности денатурируемых в стрессовых условиях белков от агрегации и обеспечивающий их дальнейшее правильное сворачивание или же отправку на деградацию. Белки этого класса принимают участие в транспорте пептидных структур через митохондриальные и клеточные мембраны, эндоцитозе. В зависимости от внеклеточной или внутриклеточной локализации такие белки участвуют соответственно в аутоиммунном маркировании опухолевых клеток или в их защите от стрессов и апоптоза [1, 2]. Глобула Hsp70 состоит из двух функционально различных элементов: N-концевой АТФ-азный домен гидролизует АТФ до АДФ с образованием неорганического фосфата; С-концевой домен присоединения субстрата связывает гидрофобные пептиды. АТФ-азный домен образован двумя круп-

ными субдоменами I и II, каждый из которых условно разделен на участки А и В (см. *рис. 1*). Между субдоменами I и II располагается щель, на дне которой связывается АТФ. АТФ-азный домен содержит также участок присоединения фактора обмена нуклеотида, который, раздвигая субдомены I и II, способствует «перезарядке» АДФ на АТФ [3, 4].

Домен присоединения субстрата (SBD, Substrate Binding Domain) состоит из β-листового субдомена (βSBD), связывающего субстратный пептид, и α-спиральной «крышки» (αSBD), образованной пятью α-спиралями А, В, С, D и E (см. *рис. 1*). За счет конформационных изменений, опосредованных гидролизом АТФ и действием кошаперона Hsp40, субстратсвязывающий домен способен переходить из закрытого в открытое состояние, при этом «крышка» регулирует доступность субстратсвязывающего домена для гидрофобных участков пептидов-мишеней [5].

Рис. 1. АТФ-азный домен Hsp70 человека в комплексе с ADP (слева; pdb ID 1HJO [6]) и субстрат-связывающий домен шаперона DnaK *E. coli*, прокариотического гомолога Hsp70 (справа; желтым отмечен α SBD, зеленым – β SBD, красным – субстратный пептид; pdb ID 1DKZ) [7].



Опосредуемые кошапероном Hsp40 гидролиз АТФ и присоединение субстрата приводят к отделению субстратсвязывающего домена Hsp70 от АТФ-азного домена, в результате чего они остаются связанными гидрофобным линкером. Известно, что Hsp70 способен образовывать в растворе олигомеры. Скорее всего, это происходит за счет того, что субстратсвязывающий домен Hsp70 способен связывать гидрофобный линкер другой молекулы Hsp70 в момент, когда ее домены разобщены [8, 9].

Гидролиз АТФ индуцируется J-доменом кошаперона Hsp40. Изучение связывания Hsp70 и Hsp40 показало, что остаток аспарагиновой кислоты (Asp35) J-домена Hsp40 дрожжей взаимодействует с остатком Arg171 Hsp70, что влечет за собой гидролиз АТФ и последующее отделение доменов Hsp70 друг от друга. Предполагается, что сигнал к гидролизу АТФ идет по цепочке J-домен Hsp40 → Arg171 (линкер Hsp70) → Tyr371 (АТФ-азный домен Hsp70) → Ile181 (АТФ-азный домен Hsp70) [10–12], после чего происходит связывание субстратного пептида и расхождение доменов. Точный механизм этого процесса еще не известен.

Предполагается, что структура пептидсвязывающего домена Hsp70 млекопитающих аналогична структуре подобного домена у их прокариотического гомолога DnaK (рис. 1) [7]. Хотя установлена структура отдельных элементов субстратсвязывающего домена Hsp70 [11, 13], однако полноразмерная трехмерная структура Hsp70 млекопитающих на данный момент неизвестна. В настоящей работе предпринята попытка построения трехмерной структуры полноразмерного Hsp70 при помощи методов молекулярного моделирования. Структура представляет интерес не только при изучении взаимодействия АТФ-азного и субстратсвязывающего доменов шаперона, но и как перспективная мишень при поиске противоопухолевых препаратов. В силу своих иммуногенных свойств шапероны служат объектом

успешных фармакологических исследований [5, 14]. Получение достоверной структуры шаперона Hsp70 человека и продвижение в понимании механизма его функционирования поможет ускорить и удешевить исследования в области шаперон-ассоциированных стратегий терапии онкологических заболеваний.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Моделирование по гомологии проводили с помощью сервиса Swiss Model [15, 16]. Подготовку системы для расчетов молекулярной динамики осуществляли в программе tleap (пакет программ AmberTools 1.2). Молекулярную динамику проводили в пакете программ Amber10 [17]. Молекулу белка помещали в ячейку кубической формы таким образом, чтобы расстояние от белка до ее стенок было не менее 12 Å. В качестве растворителя использовали воду TIP3P. Шаг интегрирования на всех этапах принимали равным 2 фс. Минимизация энергии ограничивалась 5000 шагов, алгоритм steepest descent сменялся на conjugated gradient после 2500 шагов. Радиус обрезки электростатических и ван-дер-ваальсовых взаимодействий (cutoff distance) составлял 10 Å.

Исследуемые структуры приводили в равновесие в четыре этапа: минимизация энергии с силовыми ограничениями на все атомы белка, минимизация энергии без силовых ограничений, разогрев и молекулярная динамика. Разогрев от 0 до 300 К производили при постоянном объеме в течение 50 пс. Молекулярную динамику проводили при постоянном давлении. Для контроля температуры использовали термостат Ланжевена. Эти же параметры использовали для запуска управляемой молекулярной динамики. При симуляциях разрыва солевых мостиков силовую константу принимали равной 20 ккал/моль·Å².

Для визуального анализа трехмерных структур использовали программу VMD 1.8.6 [18].

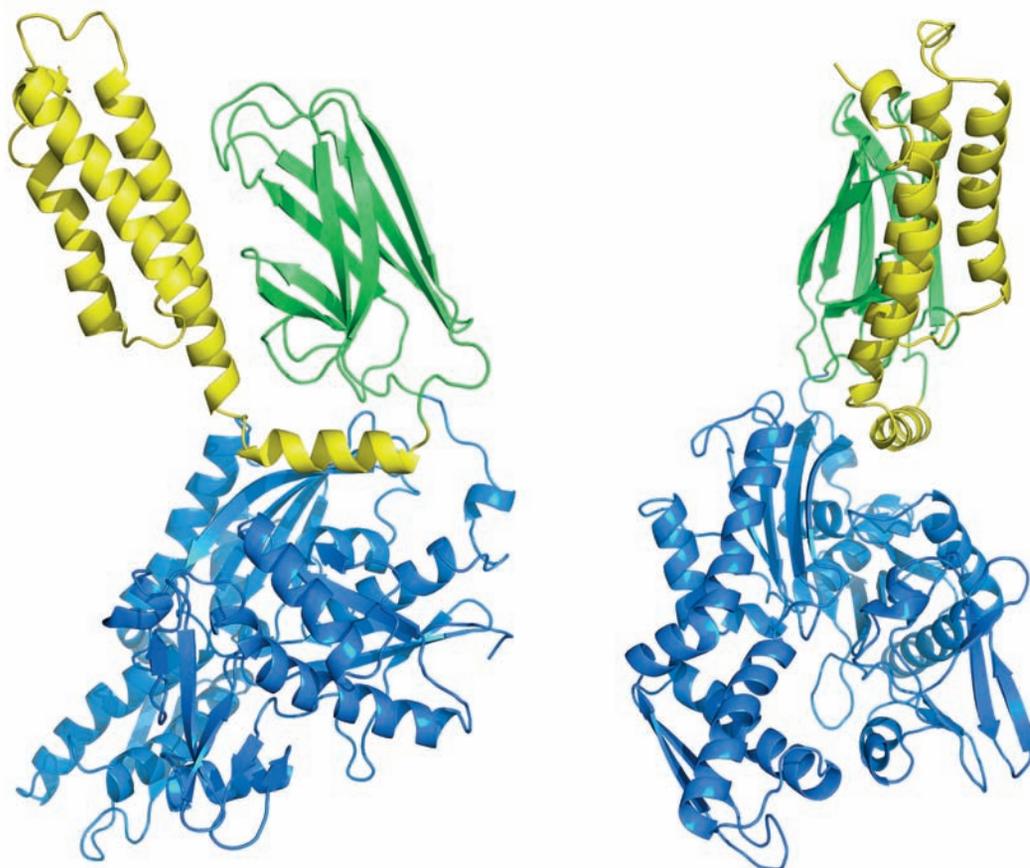


Рис. 2. Модель hHsp70_2p32 после уравнивания. АТФ-азный домен обозначен синим цветом, α SBD – желтым, β SBD – зеленым.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Моделирование полноразмерной структуры Hsp70

При моделировании использовали следующие элементы банка данных структур белков (PDB): субстратсвязывающий домен DnaK *Escherichia coli* (1DKZ; *pus. 1*); α -субдомен субстратсвязывающего домена нематоды *Caenorhabditis elegans* (2P32 [19]); АТФ-азный домен, β SBD и α -спираль 'А' α SBD Hsc70 быка *Bos taurus* (1YUW). Последняя структура описывает контакт АТФ-азного домена с субстратсвязывающим доменом в момент, когда домены жестко сцеплены друг с другом.

Модель hHsp70_1dkz

Моделирование проводили в три стадии:

1. По аминокислотной последовательности Hsp70 человека (human Hsp70, hHsp70) (PID: P08107) и третичной структуре его близкого гомолога из *B. taurus* – Hsc70 (1YUW), построена модель, описывающая АТФ-азный домен, β SBD и спираль 'А' α SBD. Идентичность сконструированной структуры и шаблона составляла 88.6%. Для получения полноразмерной структуры требовалось достроить оставшуюся часть α SBD.
2. В качестве шаблона для построения α SBD ис-

пользовали структуру DnaK (прокариотического гомолога Hsp70) 1DKZ, где α -субдомен в комплексе с β -субдоменом образовывали полноразмерный субстратсвязывающий домен. Идентичность сконструированной структуры и шаблона составляла 44.7%.

3. Полученные структуры накладывали друг на друга по β SBD. После наложения в результирующей структуре оставили β SBD из модели, построенной по гомологии с 1YUW.

Таким образом была создана конструкция, АТФ-азный домен и β -субдомен SBD которой построены по гомологии с близким эукариотическим родственником Hsp70, а α SBD – по гомологии с прокариотическим шапероном DnaK из *E. coli*. Модель уравнивали с помощью симуляции молекулярной динамики в течение 6.5 нс.

Анализ молекулярно-динамической траектории показал, что пространственные структуры АТФ-азного домена и β SBD стабильны, в то время как сегмент α SBD, образованный α -спиралями 'В'-'Е', склонен к разворачиванию.

Модель hHsp70_2p32

В качестве альтернативного гомологического шаблона для моделирования нестабильного участка α SBD использовали соответствующую структуру из орга-

низма нематоды (*C. elegans*; PDB ID: 2P32). С помощью сервиса SwissModel проведено моделирование элементов α SBD hHsp70, которые совпадали по выравниванию с аминокислотной последовательностью структуры 2P32 (аминокислотные остатки 533–614). Идентичность полученной структуры и шаблона составляла 63%. Созданные конструкции накладывали на модель hHsp70_1dkz по α -спирали 'B', после чего часть α -спирали 'B', а также спирали 'C', 'D' и 'E' заменяли на соответствующие элементы, построенные по гомологи с 2P32. Полученную модель уравнивали в течение 8.5 нс.

Структура hHsp70_2p32 после уравнивания изображена на рис. 2. Спиральи 'B', 'C' и 'D' образуют пучок, похожий по третичной структуре на 1DKZ, однако, в отличие от него, в hHsp70_2p32 α -спираль 'E' редуцировалась. По данным анализа молекулярно-динамической траектории построенная структура проявила высокую стабильность и была принята в качестве рабочей для дальнейших исследований.

Изучение междоменных взаимодействий hHsp70

В процессе функционирования исследуемого шаперона образующие его домены расходятся с разрывом всех нековалентных взаимодействий между ними, в результате чего остаются связанными лишь междоменным линкером.

С помощью метода управляемой молекулярной динамики (Steered Molecular Dynamics) изучен процесс расхождения доменов. Выявлены ключевые для этого процесса солевые мостики и показано, что обратное сближение доменов не зависит от изменения конформации АТФ-азного домена. В качестве модели использовали hHsp70_2p32 (в дальнейшем просто hHsp70).

Разрыв солевого мостика Arg171 : Glu516

По данным работы [12], расхождение доменов начинается с опосредованного кошапероном Hsp40 разрыва солевого мостика Arg171 : Glu516, соединяющего α -спираль 'A' субстратсвязывающего домена с субдоменом IA АТФ-азного домена. Моделирование этого процесса проведено с помощью метода управляемой молекулярной динамики путем имитации раздвижения C_{α} -атомов указанных аминокислотных остатков на 10 Å. Исходное расстояние между атомами составляло 12 Å (расстояние между взаимодействующими участками – 4 Å).

Общая работа, затраченная на раздвижение указанных атомов, составила 34.3 ккал/моль. Примечательно, что после фактического разрыва солевого мостика Arg171 : Glu516 среднее расстояние между петлями АТФ-азного домена, фиксирующими β - и γ -фосфаты АТФ, сократилось на 2 Å (с 8 до 6 Å; рис. 3). Теоретически подобное движение в нативном

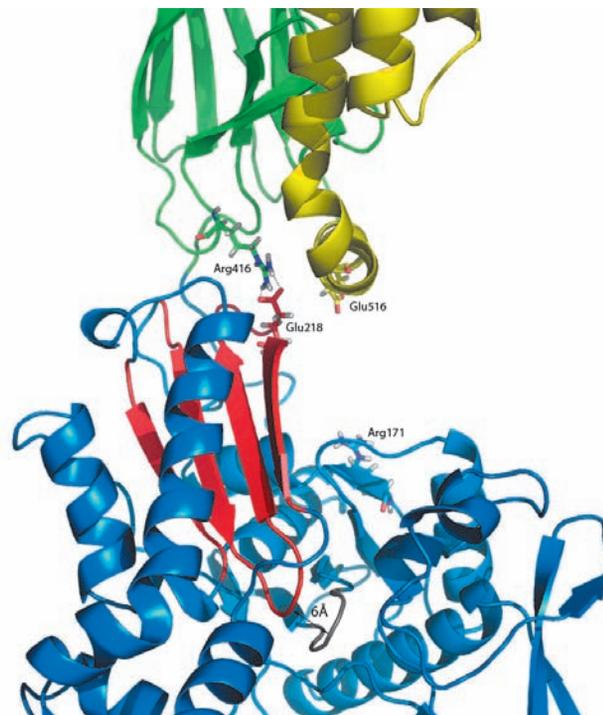


Рис. 3. Перестройка солевого мостика при расхождении доменов hHsp70: справа разорванный солевой мостик Arg171 : Glu516, слева второй мостик Arg416 : Glu218 до симуляции его разрыва. Красным отмечен β -лист, включающий Glu218 и петлю, фиксирующую АТФ. Вторая петля, принимающая участие в фиксации, отмечена серым цветом.

ферменте может вызывать гидролиз АТФ. В таком случае солевой мостик Arg171 : Glu516 сдерживает АТФ-азный домен hHsp70 от спонтанного гидролиза АТФ, а кошаперон, разрывая эту связь, тем самым инициирует этот процесс.

Полученная структура уравнивалась в течение 1 нс. Тенденций к восстановлению разорванной связи Arg171 : Glu516, как и к дальнейшему расхождению доменов, при этом не выявлено.

Разрыв солевого мостика Arg416 : Glu218

Разрыв мостика Arg171 : Glu516 привел лишь к частичному отделению доменов друг от друга, однако окончательного расхождения не произошло. В связи с этим предстояло выявить наиболее стабильные в ходе предыдущих молекулярно-динамических исследований нековалентные связи, разрыв которых мог бы привести к полному расхождению доменов hHsp70.

Первоначально был выбран солевой мостик Arg155 : Glu523, соединяющий α -спираль 'A' с субдоменом IA, однако его разрыв не привел к расхождению доменов и не выявил никаких тенденций к по-

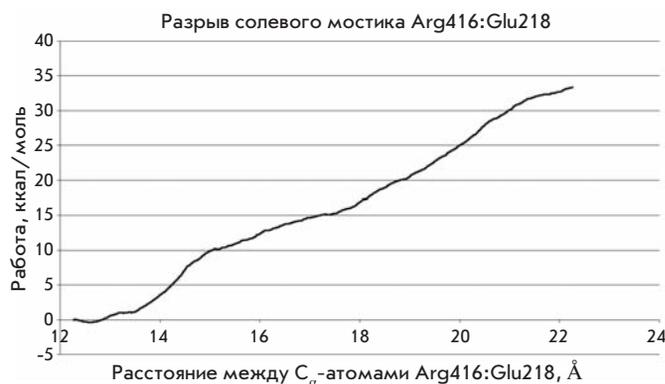


Рис. 4. Работа, затраченная на второй этап симуляции расхождения АТФ-азного и субстратсвязывающего доменов.

ложительному развитию процесса. Отрицательный результат позволил сделать вывод о том, что, скорее всего, связью, ключевой для расхождения доменов, остается солевой мостик Arg416 : Glu218, соединяющий один из поворотов β -субдомена SBD с субдоменом ПА АТФ-азного домена.

Исходное расстояние между C α -атомами аминокислотных остатков, образующих связь, составляло 12.2 Å, после имитации разрыва – 22.2 Å. Общая работа, затраченная на разрыв этой связи, составила 33.4 ккал/моль. На кривой, отображающей этот процесс, наблюдается скачок: увеличение расстояния с 13.4 до 14.7 Å, сопровождавшееся непосредственным разрывом интересующей нас связи, потребовало около 7 ккал/моль (рис. 4).

Работа, затраченная на разрыв связи, равна энергии, выделяющейся при гидролизе АТФ, поэтому можно предположить, что разрыв макроэргической связи в АТФ в АТФ-азном домене (предположительно вызванный разрывом мостика Arg171 : Glu516) требуется для разрыва солевого мостика Arg416 : Glu218. Glu218 является частью β -листа (образованного аминокислотными остатками 192–226 и 332–338; рис. 5), второй β -поворот которого непосредственно фиксирует β - и γ -фосфаты молекулы АТФ. Первый β -поворот принимает участие в связывании АТФ-азного и субстратсвязывающего доменов. Учитывая тот факт, что β -лист является жесткой структурой, его смещение, опосредованное гидролизом АТФ, вполне может вызвать разрыв второй связи, необходимой для расхождения доменов.

Как и ожидалось, симуляция разрыва связи Arg416 : Glu218 привела к полному расхождению доменов. Полученная структура уравнивалась на протяжении 1.5 нс, в течение которых никаких значительных изменений в структуре исследуемого шаперона не замечено.

В процессе моделирования расхождения доменов выяснился интересный факт: освободившиеся от солевых мостиков остатки Arg416 и Glu516 в дальнейшем образовали друг с другом новый солевой мостик (см. рис. 5). Образование аналогичного солевого мостика стерически возможно и между Arg171 и Glu218.

На основании этих данных можно сделать вывод о важной роли междоменных солевых мостиков в функционировании hHsp70: мостики Arg171 : Glu516 и Arg416 : Glu218 связывают АТФ-азный и субстратсвязывающий домены, однако по мере расхождения доменов партнеры перестраиваются и образуются солевые мостики Arg171 : Glu218 и Arg416 : Glu516, которые стабилизируют новое структурное состояние шаперона.

Симуляция раздвижения субдоменов I и II

В процессе обмена нуклеотида АТФ-азный и субстратсвязывающий домены сходятся обратно, однако силы, заставляющие их это сделать, достоверно не установлены. Стохастический характер схождения доменов представляется маловероятным. Ввиду того, что обмен нуклеотида проходит при разобщенных доменах и сопровождается взаимодействием АТФ-азного домена с фактором обмена нуклеотидов, естественно пред-

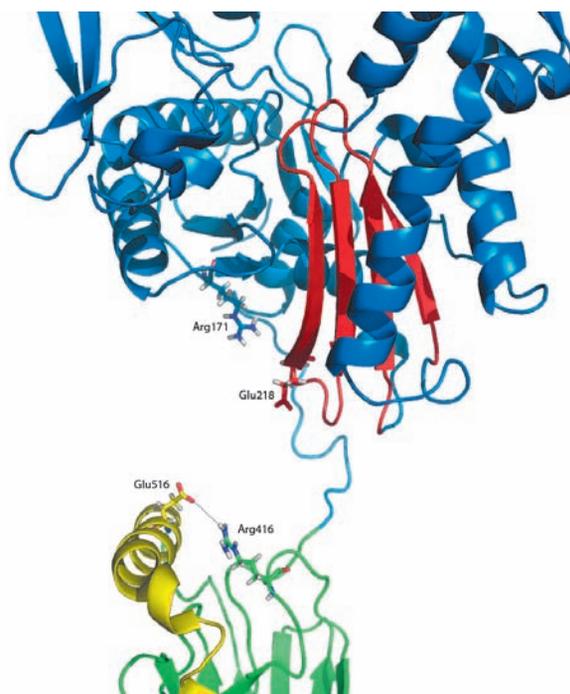


Рис 5. hHsp70 после симуляции расхождения доменов. Красным отмечен β -лист, движение которого сопровождается разрывом второго солевого мостика Glu218 : Arg416. Пунктиром обозначен образовавшийся после расхождения доменов солевой мостик Glu516 : Arg416.

положить, что раздвижение субдоменов I и II фактором нуклеотидного обмена теоретически способно повлиять на схождение АТФ-азного и субстратсвязывающего доменов. Мы провели моделирование этого процесса. При симуляции раздвижения субдоменов I и II точками приложения силы являлись атомы азота, принадлежащие остаткам Thr14 и Gly203, непосредственно взаимодействующим с АТФ/АДР.

Исходное расстояние между ними составляло 7.3 Å, конечное – 14.3 Å. Несмотря на теоретическую возможность того, что обмен нуклеотида повлияет на схождение доменов, мы получили достаточно предсказуемый результат: изменение расстояния между субдоменами I и II никак не отразилось на взаимодействии доменов друг с другом. Этот результат говорит о том, что схождение доменов, вероятнее всего, опосредуется неким белком, которым вполне может быть другой шаперон hHsp70. Теоретически он способен связать высвободившийся при расхождении доменов гидрофобный линкер в качестве субстрата и таким образом сблизить разошедшиеся домены. Однако эта гипотеза требует дальнейшей проверки.

ВЫВОДЫ

На основании проведенного исследования можно предложить следующую схему функционирования hHsp70: при взаимодействии с J-доменом кошаперона Hsp40 происходит разрыв солевого мостика Arg171 : Glu516, что приводит к сближению петель, фиксирующих АТФ, и способствует гидролизу АТФ.

Гидролиз АТФ, в свою очередь, сопровождается смещением β-листа, содержащего одну из петель, фиксировавших АТФ, и расположенного в области междоменного контакта остатка Glu218, что влечет за собой разрыв солевого мостика Arg416 : Glu218. Разрыв солевого мостика Arg416 : Glu218 приводит к расхождению АТФ-азного и субстратсвязывающего доменов, а остаток Arg416 образует солевой мостик с Glu516, входящим в субстратсвязывающий домен. Остаток Arg171, в свою очередь, образует новый солевой мостик с Glu218, и происходит перегруппировка солевых мостиков, ранее связывавших АТФ-азный и субстратсвязывающий домены hHsp70.

Роль фактора обмена нуклеотида в функционировании hHsp70, по-видимому, заключается не только в обмене АДФ на новую молекулу АТФ, но и в фиксации субдоменов I и II в раздвинутом состоянии, которое сопровождается сближением АТФ-азного и субстратсвязывающего доменов с образованием солевого мостика Arg171 : Glu516, что образно может быть охарактеризовано как «взведение курка» для осуществления гидролиза следующей молекулы АТФ. «Пальцем», способным вновь нажать на этот курок, является J-домен кошаперона Hsp40.

Построенная и уравновешенная модель Hsp70 человека доступна в депозитарии PMDB [20, 21] (PMDB id: PM0076412). ●

*Работа была поддержана грантом
РФФИ 09-04-92744-ННИОМ_а.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Multhoff G., Pfister K., Gehrman M., Hantschel M., Gross C., Hafner M., Hiddemann W. // Cell Stress Chaperones. 2001. V. 6. № 4. P. 337–344.
- Schmitt E., Gehrman M., Brunet M., Multhoff G., Garrido C. // J. Leukoc. Biol. 2007. V. 81. № 1. P. 15–27.
- Vogel M., Bukau B., Mayer M.P. // Mol. Cell. 2006. V. 21. № 3. P. 359–367.
- Nollen E.A., Kabakov A.E., Brunsting J.F., Kanon B., Höhfeld J., Kampinga H.H. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. № 7. P. 4677–4682.
- Гужова И.В., Новоселов С.С., Маргулис Б.А. // Цитология. 2005. Т. 47. № 3. С. 187–199.
- Osipiuk J., Walsh M.A., Freeman B.C., Morimoto R.I., Joachimiak A. // Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 1999. V. 55. № 5. P. 1105–1107.
- Zhu X., Zhao X., Burkholder W.F., Gragerov A., Ogata C.M., Gottesman M.E., Hendrickson W.A. // Science. 1996. V. 272. № 5268. P. 1606–1614.
- Chang Y., Sun Y., Wang C., Hsiao C. // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. № 22. P. 15502–15511.
- Freeman B.C., Myers M.P., Schumacher R., Morimoto R.I. // EMBO J. 1995. V. 14. № 10. P. 2281–2292.
- Mitra A., Shevde L.A., Samant R.S. // Clin. Exp. Metastasis. 2009. V. 26. № 6. P. 559–567.
- Chou C., Forouhar F., Yeh Y., Shr H., Wang C., Hsiao C. // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. № 32. P. 30311–30316.
- Jiang J., Maes E.G., Taylor A.B., Wang L., Hinck A.P., Lafer E.M., Sousa R. // Mol. Cell. 2007. V. 28. № 3. P. 422–433.
- Jiang J., Prasad K., Lafer E.M., Sousa R. // Mol. Cell. 2005. V. 20. № 4. P. 513–524.
- Mazzaferro V., Coppa J., Carrabba M.G., Rivoltini L., Schiavo M., Regalia E., Mariani L., Camerini T., Marchianò A., Andreola S., Camerini R., Corsi M., Lewis J.J., Srivastava P.K., Parmiani G. // Clin. Cancer Res. 2003. V. 9. № 9. P. 3235–3245.
- Arnold K., Bordoli L., Kopp J., Schwede T. // Bioinformatics. 2006. V. 22. P. 195–201.
- Kiefer F., Arnold K., Künzli M., Bordoli L., Schwede T. // Nucl. Acids Res. 2009. V. 37. P. 387–392.
- Case D.A., Darden T.A., Cheatham T.E., Simmerling C.L., Wang J., Duke R.E., Luo R., Crowley M., Walker R.C., Zhang W., Merz K.M., Wang B., Hayik S., Roitberg A., Seabra G., Kolossvary I., Wong K.F., Paesani F., Vanicek J., Wu X., Brozell S.R., Steinbrecher T., Gohlke H., Yang L., Tan C., Mongan J., Hornak V., Cui G., Mathews D.H., Seetin M.G., Sagui C., Babin V., Kollman P.A. // AMBER 10. San Francisco: University of California, 2008.
- <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/vmd-1.8.6/>
- Worrall L.J., Walkinshaw M.D. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2007. V. 357. P. 105–110.
- <http://mi.casput.it/PMDB/main.php>
- Castrignanò T., De Meo P.D., Cozzetto D., Talamo I.G., Tramontano A. // Nucl. Acids Res. 2006. V. 34. P. 306–309.

УДК 577.113:577.323.3:577.323.5

Классификация G-квадруплексных ДНК по углу вращения квадруплекса и планарности G-квартетов

Р. В. Решетников^{1,4}, А. М. Копылов^{2,3,4}, А. В. Головин^{1,4*}¹Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 73²Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3³НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40⁴ООО «Апто-Фарм», 115446, Москва, Коломенский пр., 13А

*E-mail: golovin@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 08.09.2010 г.

РЕФЕРАТ Работа посвящена анализу структуры G-квадруплексных ДНК методами биоинформатики. Интерес к квадруплексным ДНК определяется их участием в функционировании теломер, онкопроторов, возможностью создания на их основе аптамеров и наноконструкций. Разработан алгоритм общего анализа полиморфизма структуры квадруплексов из банка данных PDB с помощью оригинальных параметров. 74 структуры были сгруппированы по следующим параметрам: количество тяжей ДНК, количество квартетов, положение и ориентация соединяющих их петель. Для описания структуры квадруплекса использовали два количественных параметра: угол поворота между двумя соседними квартетами (как для комплементарной пары в двойной спирали ДНК) и планарность квартетов (оригинальный параметр). Паттерны распределения этих значений являются специфичными для каждой группы квадруплексных структур и зависят от типа петель, соединяющих квартеты: диагональные, латеральные, пропеллерные. Эталонном для сравнения выбран тетрамолекулярный квадруплекс, образованный четырьмя тяжями ДНК, который не содержал петель. Латеральные петли сильнее всего искажают структуру квадруплексов: углы поворота отличаются низкими значениями и не характерны для других типов квадруплексов. Петли диагонального типа деформируют квадруплексы значительно слабее; структуры с пропеллерными петлями характеризуются оптимальной геометрией G-квартетов. Таким образом, найдена корреляция между углом поворота и напряженностью структуры квадруплексной ДНК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА G-квадруплекс, G-квартет, угол закручивания, петли, структура.

ВВЕДЕНИЕ

G-квадруплексы

Известно, что тяжи гуанозиновых олиго- и полинуклеотидов способны агрегировать друг с другом при условии, что моновалентный катион, такой, как калий или натрий, представлен в растворе. С помощью дифракционного анализа было показано, что такие поли(G)-нити представляют собой новый тип укладки ДНК, четырехцепочечную спираль [1–3], где четыре гуаниновых основания из разных цепей образуют плоскую структуру, удерживаемую G-G-парными взаимодействиями (рис. 1). Такие структуры отличаются высокой стабильностью и называются гуаниновыми (G)-квартетами, или G-тетрадами.

Каждый G-квартет скреплен в сумме восемью водородными связями, образованными взаимодействиями Уотсон-Криковской стороны одного гуанинового основания с Хугстиновской стороной другого.

Нуклеиновые кислоты, содержащие G-тетрадный мотив, представляют интерес не в последнюю очередь потому, что гуанин-богатые последовательности чрезвычайно широко представлены во всех открытых на данный момент геномах. Такие мотивы были обнаружены в промоторных регионах и сайтах переключения в составе последовательности иммуноглобулиновых генов, «горячих точках» рекомбинации и др. [4]. G-квартеты также представлены в ДНК на концах эукариотических хромосом, известных как теломеры [5]. Теломерная ДНК представляет из себя тандемные

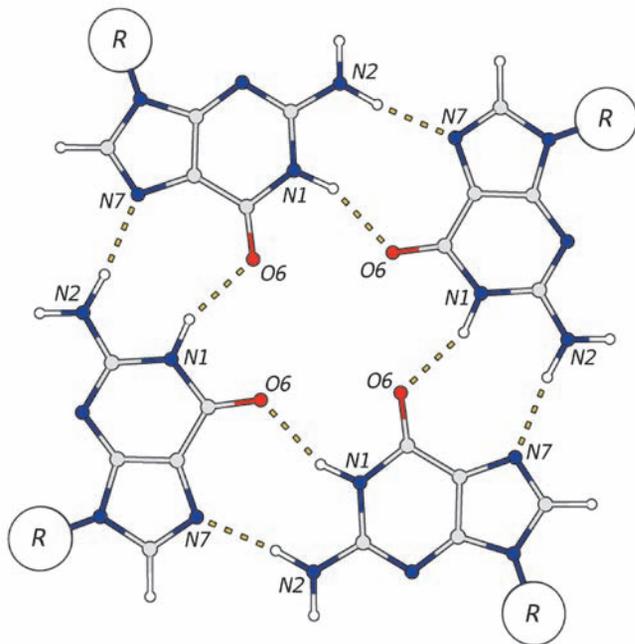


Рис. 1. Организация G-квартета. Четыре остатка гуанина образуют квадратную компланарную структуру, каждое гетероциклическое основание является донором и акцептором водородной связи: N1 и N2 с одной стороны гетероцикла, O6 и N7 с другой стороны гуанозина приводят к образованию 8 водородных связей на квартет. Сахарофосфатный остов оснований ДНК обозначен R.

повторы коротких поли-G-блоков, которые иногда включают в себя аденины или тимины: $G_n T_n$, $G_n T_n G_n$, $G_n A_n$ или $(TTAGGG)_n$; теломерные ДНК ассоциированы с теломерными белками. Тип повтора является видовзависимым: например, повтор $(TTAGGG)_n$ характерен для млекопитающих. Функция теломер заключается в защите хромосомных концов от нежелательных повреждений в результате рекомбинации или воздействия нуклеаз. Человеческая теломерная ДНК в соматических клетках в среднем составляет 8–10 т.п.о. Терминальные же 100–200 нуклеотидов с 3'-конца представляют собой однотяжевой «хвост» [6], конформационно ничем не ограниченный. В живых клетках этот «хвост» ассоциирован с белком POT1 [7], в отсутствие же этого белка однотяжевая теломерная ДНК способна складываться и димеризоваться, формируя четырехцепочечные шпильки, которые могут стабилизироваться формированием гуаниновых тетрад [8, 9]. Другой способ стабилизации такой ДНК – формирование внутримолекулярных G-квартетов путем многократного складывания. Такие G-квартетсодержащие структуры называются квадруплексами или тетраплексами [10]. Помимо теломер, G-квадруплексные последовательности были

локализованы в промоторах ряда онкогенных и ассоциированных с раком генов, таких, как *k-ras* [11], *c-kit* [12] и *bcl2* [13]. Таким образом, выглядит перспективной возможность ингибирования экспрессии соответствующих генов с помощью специфичных к квадруплексам агентов, таких, как порфирин TMPyP4 [14, 15].

G-квадруплексы могут быть также образованы короткими олигонуклеотидами с соответствующей последовательностью, которую можно записать как $G_m X_n G_m X_o G_m X_p G_m$, где m – количество гуанинов в G-блоке. Эти гуанины обычно непосредственно задействованы в образовании G-тетрад. X_n , X_o и X_p могут быть комбинацией любых остатков, включая G; такие участки формируют петли между G-тетрадами.

Некоторые из таких последовательностей обладают аптамерными свойствами при сворачивании в квадруплексные структуры. Аптамеры – это короткие синтетические олигонуклеотиды или пептиды, способные специфически узнавать любые мишени, от малых молекул до целых клеток, являясь аналогами моноклональных антител [16, 17]. Были идентифицированы G-квадруплексные аптамеры, мишенями которых является широкий спектр белков, таких, как тромбин [18] и STAT-3 [19]. Существуют G-квадруплексные аптамеры с антираковыми свойствами, для которых проводят клинические испытания. Механизм их действия связан с белком нуклеолином и его ролью в процессинге РНК [20].

Общие структурные черты квадруплексных ДНК

Формирование квадруплексной структуры из заданной квадруплексной последовательности может происходить различными путями, в зависимости от количества G-блоков. Четыре отдельных цепи могут ассоциироваться друг с другом с образованием межмолекулярного G-квадруплекса (рис. 2). Внутри-

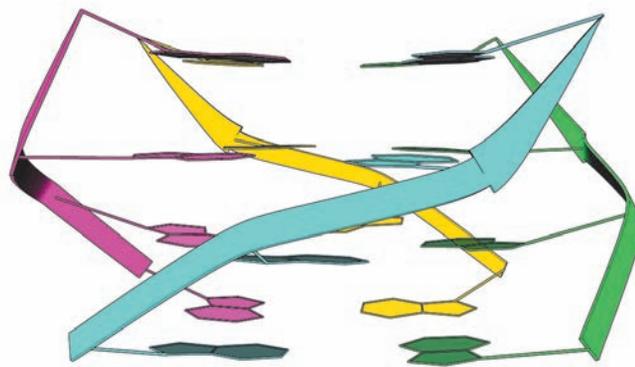


Рис. 2. Четырехтяжевой межмолекулярный параллельный G-квадруплекс.

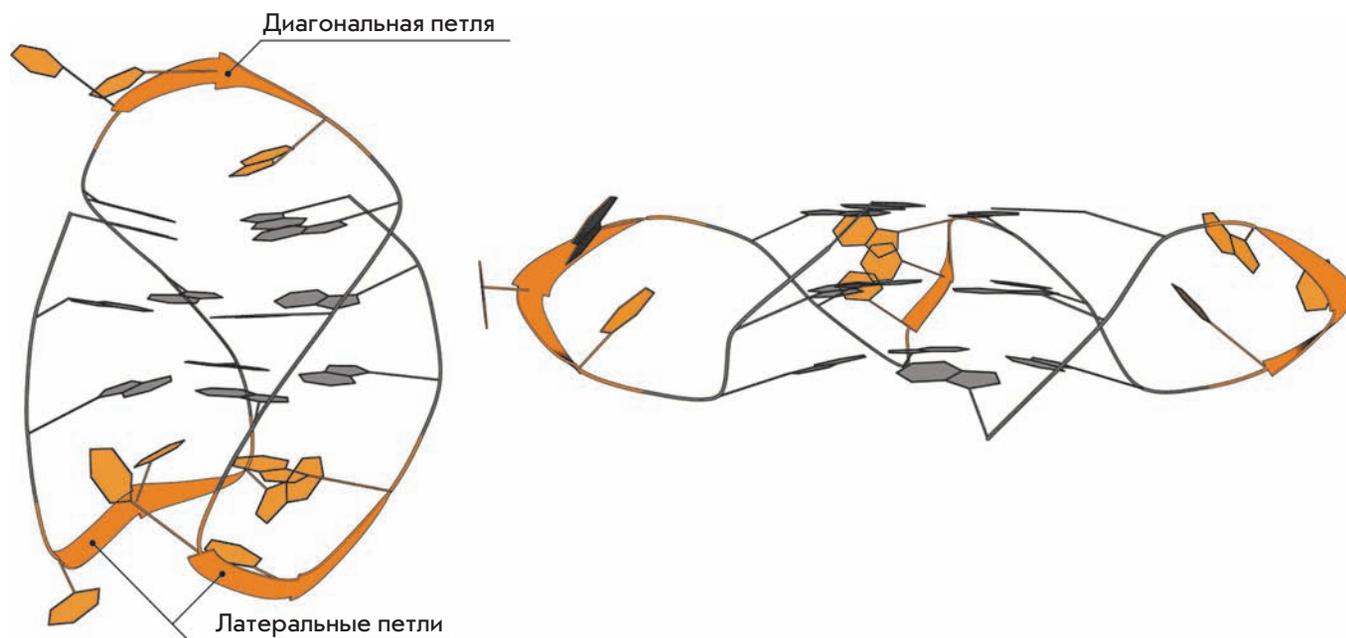


Рис. 3. Сворачивание цепи ДНК в одномолекулярный G-квадруплекс с тремя G-тетрадами. Два варианта укладки олигонуклеотида $d(AGGG(ТTAGGG)_3)$ различаются направленностью полинуклеотидной цепи в различных тяжах квадруплекса. Слева – топология с петлями латерального и диагонального типов [23], справа – топология с петлями пропеллерного типа, обрабатывающими ход цепи [24].

молекулярные тетраплексы образуются из одноцепочечной молекулы в результате сложной пространственной укладки нуклеотидной цепи (рис. 3).

Фундаментальный строительный элемент всех квадруплексных структур – G-квартет. Квартеты в структуре квадруплекса располагаются друг над другом, минимум два квартета необходимо для структурной стабильности тетраплекса [21]. Количество гуанинов в каждом отдельном G-блоке напрямую связано с количеством G-тетрад в окончательно свернутом квадруплексе. Например, в теломерных ДНК млекопитающих с тандемным повтором $d(ТTAGGG)$ квадруплексы, образованные четырьмя такими повторами, имеют три расположенных друг над другом G-квартета [22].

Квадруплекс стабилизируют те же самые факторы, что и дуплексную ДНК: стэкинг-взаимодействие оснований, водородные связи, электростатические взаимодействия и гидратная оболочка. Гидратация сахарофосфатного остова очень важна для стабильности структуры: в упорядоченной гидратной оболочке молекулы воды с помощью разветвленной сети водородных связей объединяют в единое целое основания, сахара и заряженные фосфаты, которые локализованы на внешней поверхности квадруплекса [25–27].

Кроме этих стандартных для дуплексной ДНК стабилизирующих факторов, у квадруплексов су-

ществует весьма специфическая важная составляющая – большой вклад в стабильность вносит координация O6 карбонил-катионами [28, 29]. Атомы O6 образуют квадрат в каждом квартете, что в квадруплексе дает бипирамидную антипризму с расстоянием 3.3 Å между квартетами [30]. Это отрицательно заряженное пространство между тетрадами должно быть стабилизировано путем координации катиона. На стабильность образованного квадруплекса существенно влияет природа катиона – размер/ионный радиус и заряд [29].

Четыре гуанозинового нуклеотида в составе тетрады могут существовать либо в *анти*-, либо в *син*-конформации относительно гликозидной связи, таким образом, существует 16 возможных комбинаций. Взаимная ориентация отдельных цепей в квадруплексе влияет на гликозидные углы. Например, при параллельной ориентации всех четырех цепей (рис. 2) все гликозидные углы находятся в *анти*-конформации. При антипараллельной ориентации в составе квадруплексов присутствуют как *син*-, так и *анти*-гуанины вне зависимости от того, образован квадруплекс четырьмя цепями или одной.

Различные нуклеотидные последовательности между G-блоками формируют внеспиральные петли. Эти петли бывают трех типов. В параллельном внутримолекулярном квадруплексе необходима петля, соединяющая нижнюю G-тетраду с верхней,

в результате чего получаются петли пропеллерного типа (рис. 3, справа). Антипараллельные квадруплексы – это такие, в которых хотя бы одна цепь антипараллельна другим. Такая топология тетрад обнаружена в большинстве определенных на текущий момент бимолекулярных и внутримолекулярных квадруплексных структур. Помимо пропеллерных петель, в этих структурах наблюдаются еще два типа петель. Латеральные (боковые) петли соединяют соседние G-тяжи. Две таких петли могут располагаться как с одного, так и с противоположных полюсов молекулы, что соответствует расположению «голова к голове» или «голова к хвосту» в бимолекулярных комплексах. Второй тип антипараллельных петель – диагональные петли, соединяющие opposite G-тяжи (рис. 3, слева).

Все квадруплексные структуры имеют четыре бороздки, в отличие от двойной спирали, имеющей только две. Бороздки образуются полостями, ограниченными сахарофосфатными остовами. Размеры бороздок очень сильно разнятся, в зависимости от общей топологии и природы петель, а также гликозидных углов. В квадруплексах с петлями исключительно диагонального или латерального типа бороздки структурно просты, в структурах с петлями пропеллерного типа они обладают более сложными структурными чертами.

Таким образом, существует большое число структурных переменных (количество G-тетрад, тип петлей, последовательности и длина, направленность петлей), которые приводят к большому топологическому и структурному разнообразию квадруплексов. В данной работе мы сделали попытку выявить взаимосвязь между структурой и свойствами G-квадруплексных ДНК и определить факторы, влияющие на геометрию квадруплексов.

МЕТОДЫ

Создание выборки квартетов

Список структур, содержащих квадруплексы, был составлен на основе списка базы данных PDB. Все найденные структуры были разделены на 8 групп согласно геометрии пространственной организации квадруплекса. На основе языка Perl и модулей Vector::Real и Statistics::Descriptive была разработана программа, которая определяет наличие квартетов в структуре, их расположение и измеряет геометрические параметры. Квартет определяется следующим образом: для гуанина должен существовать сосед, контактирующий атомом N7 с атомом O6 начального гуанина. Выбранная комбинация признается квартетом, если четвертый гуанин взаимодействует с первым и все гетероциклические осно-

вания находятся в одной плоскости с максимально допустимым удалением атомов от плоскости, составляющим 2 Å. Следующим квартетом квадруплекса признавался квартет, располагающийся ближе всего к исходному и для которого расстояние между атомами C1' до ближайших нуклеотидов было не более 10 Å (таким образом исключались варианты, когда тетраду составляли гуанины из разных квартетов). Структуры, принадлежащие разным ЯМР-моделям, обрабатывались как независимые квадруплексы.

Угол поворота квартетов относительно друг друга в квадруплексе

Для определения углов закрутки квадруплекса измерялся угол между двумя векторами. Первый вектор соединял атомы C1' двух соседних нуклеотидов в квартете, второй вектор соединял атомы C1' в соответствующих нуклеотидах в соседнем квартете (рис. 4).

Отклонения квартета от плоскости

Для измерения степени нарушения симметричности и планарности отдельного квартета предложен оригинальный параметр – расстояние между центрами масс двух четырехгранников. Первый четырехгранник образован четырьмя атомами N9 гуанинов квартета, а второй четырехгранник образован четырьмя атомами O6 тех же гуанинов (рис. 4). Если квартет

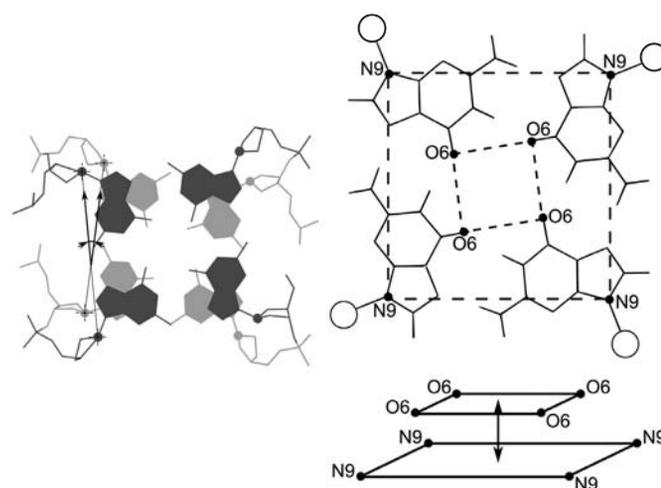


Рис. 4. Определение измеряемых параметров. Слева – определение углов закрутки квадруплекса. Кругами показаны атомы C1'. Справа – схема взаимного расположения двух четырехгранников: внешнего, образованного атомами N9, и внутреннего, образованного атомами O6. Если планарность квартета нарушается, то внутренний четырехгранник выходит из плоскости квартета. Расстояние между центрами масс внутреннего и внешнего квартетов служит численным параметром отклонения от плоскости.

симметричный и все гуанины образуют водородные связи друг с другом, то этим параметром фиксируется планарность квартета. В случае разрыва водородных связей симметрия квартета нарушается, и параметр фиксирует степень искажения квартета. Этот подход также фиксирует оба описанных выше случая одновременно.

Гистограмма распределения значений углов закрутки квадруплекса и отклонений квартета от плоскости

Для каждой из восьми полученных групп значения параметров объединялись, и строилась гистограмма распределения. Для углов закрутки выбран диапазон от 0 до 60°; отклонения от плоскости анализировались в диапазоне от 0 до 2 Å; диапазоны углов и расстояний разбивались на 15 интервалов. Данные анализировали с помощью программы Gnuplot (<http://www.gnuplot.info>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Параметры описания геометрии и конформационного полиморфизма квадруплексов

Даже поверхностный анализ многообразия обнаруженных для квартетов вариантов структур, присутствующих в базе данных PDB, приводит к заключению о необходимости систематизации и выработки универсальных параметров описания структуры квартетов и их полиморфизма. До настоящего времени такие попытки в литературе не описаны.

В данной работе в качестве структурных характеристик квадруплексов было выбрано два параметра: угол закручивания квадруплекса, т.е. угол поворота между двумя соседними квартетами, описываемый углом между двумя векторами, проходящими через атомы C1' двух соседних гуанинов (рис. 4). Этот параметр широко используется для описания структур двойной спирали [31]. Ранее нами было показано, что угол закручивания квадруплекса является мерой напряженности структуры олигонуклеотида [32]. В качестве второго параметра выбран оригинальный параметр, который описывает отклонение квартетов от планарности – расстояние между центрами масс двух квадратов, образованных атомами O6 и N9 соответственно (рис. 4). Два этих параметра позволяют в достаточной мере описать конформационный полиморфизм и конформационную подвижность структуры квадруплексной ДНК.

Четырехтяжевые параллельные квадруплексы

Состав группы (ID PDB):

- 1EVM [33], 1EVN [33], 1NP9 [34], 1NZM [35], 1O0K [36] – теломерная ДНК (человек);

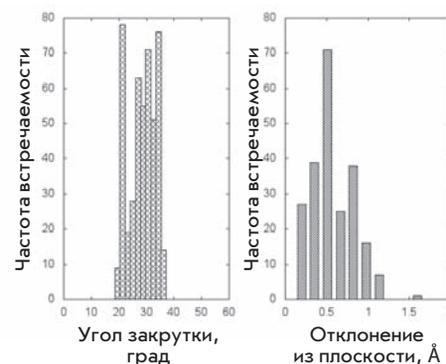


Рис. 5. Схема пространственной организации и геометрические характеристики первой группы структур.

- 139D [23, 37] – теломерная ДНК (*Tetrahymena*);
- 1EMQ [38] – теломерная ДНК (*Saccharomyces cerevisiae*);
- 1EVO [39] – фрагмент вирусного генома SV40.

Рассматриваемая группа представляет собой простейший вариант устройства квадруплексных структур. Угол закручивания в таких структурах можно рассматривать как идеальный, поскольку ассоциация четырех тяжей не накладывает никаких структурных ограничений, чего не наблюдается в случае бимолекулярных и мономолекулярных квадруплексов.

Четырехтяжевые параллельные квадруплексы характеризуются широким спектром углов закручивания (рис. 5), с двумя областями предпочтительных значений: узкой, соответствующей 21°, и более размытой, находящейся в пределах 27°–34°. Планарность квартетов таких структур также варьирует, в большинстве случаев квартеты имеют небольшое отклонение от плоскости, составляющее 0.5 Å, однако максимальные отклонения превышают 1 Å. Найденная полидисперсность параметров иллюстрирует разнообразие возможностей конформационного полиморфизма четырехтяжевых параллельных квадруплексов, в образование которых при межмолекулярной ассоциации не вносятся никаких структурных ограничений.

Структура типа «кресло»

Состав группы:

- 148D [40], 1C32 [41], 1C34 [41], 1C35 [41], 1C38 [41], 1QDF [42], 1QDH [42], 1RDE [43] – ДНК-аптамер к тромбину;
- 2KM3 [22] – теломерный повтор STAGGG (человек).

Структура типа «кресло» представляет собой мономолекулярный квадруплекс, соединенный тремя петлями латерального типа. Это в достаточной степени уникальная структура, представленная лишь двумя молекулами: 15-звенным ДНК-аптамером

к тромбину (148D, 1C32, 1C34, 1C35, 1C38, 1QDF, 1QDH, 1RDE) и 22-звенным олигонуклеотидом, образованным теломерным повтором STAGGG (2KM3). Такие структуры характеризуются значительно более низкими значениями углов поворота по сравнению с предыдущей группой межмолекулярных четырехтяжевых квадруплексов, у которых петли отсутствуют (рис. 6). Среднее значение углов закручивания квадруплексов для структур типа «кресло» составляет 15° с отклонением $\pm 5^\circ$. Квартеты таких структур характеризуются высокой планарностью, скачок значений в области $0.8\text{--}0.9 \text{ \AA}$ соответствует структурам, разрешенным в растворах с высокой ионной силой. Планарность объясняется тем, что гетероциклические основания латеральных петель образуют стэкинг-взаимодействия с основаниями квартетов и тем самым ограничивают их отклонения от плоскости.

Одномолекулярные квадруплексы с топологией цепи (3+1)

Состав группы:

- 2JSK [44], 2JSQ [44], 186D [45], 2GKU [46], 2HY9 [47], 2JPZ [48], 2JSL [44], 2JSM [44] – теломерная ДНК (человек, *Tetrahymena*);
- 2F8U [49] – промотор белка BCL2 (человек).

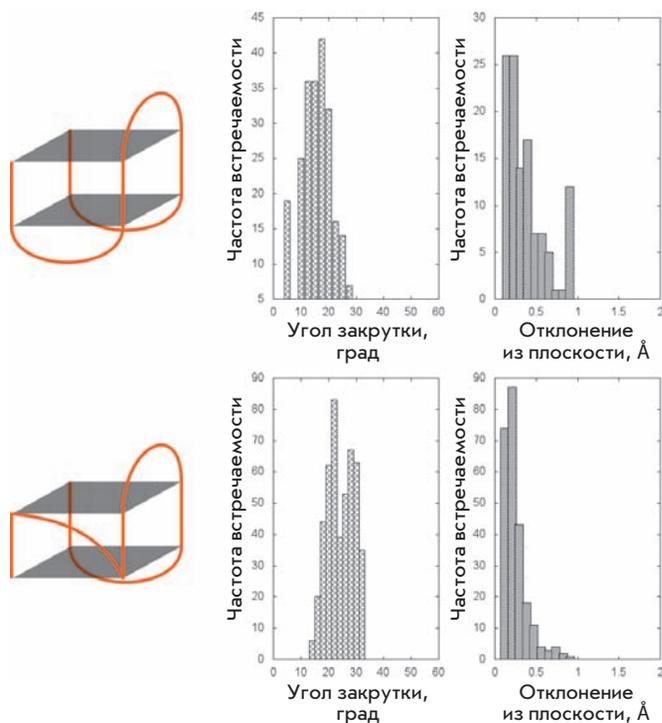


Рис. 6. Схема пространственной организации и геометрические характеристики второй и третьей групп структур.

Такие квадруплексы имеют в своем составе две петли латерального и одну пропеллерного типа, обращающую ход полинуклеотидного тяжа в обратную сторону. От предыдущего типа квадруплексов данный класс отличается только наличием пропеллерной цепи и это существенно сказывается на значениях угла закручивания (рис. 6). У паттерна распределения углов появляется дополнительное распределение с максимумом $28^\circ \pm 4^\circ$. Более того, характерные для квадруплексов с латеральными петлями значения углов закручивания в диапазоне $10^\circ\text{--}20^\circ$ сдвинуты на $2^\circ\text{--}4^\circ$ в сторону больших значений. Квартеты квадруплексов данного типа очень планарны. Как и для квартетов в предыдущем случае, планарность фиксируется стэкинг-взаимодействиями с гетероциклическими основаниями латеральных петель.

Структура типа «корзина»

Состав группы:

- 2KF8 [50], 2KKA [51], 2KOW [52], 143D [23], 230D [53], 201D [54] – теломерная ДНК (человек, *Oxytricha*).

Структуры типа «корзина» представляют собой мономолекулярный квадруплекс, соединенный двумя петлями латерального и одной диагонального типа. Как и в предыдущем случае, замена латеральной петли на диагональную приводит к изменению характера распределения углов закручивания – появляется два ярко выраженных плеча со средними значениями $18^\circ \pm 4^\circ$ и $36^\circ \pm 4^\circ$ (рис. 7). Таким образом, появление диагональной петли определяет появление в конформационном ландшафте квадруплексов новый набор структур, характеризующихся углами закручивания квадруплекса большими, чем максимальные из встречающихся в четырехтяжевых параллельных квадруплексах, не имеющих петель. Степень планарности квартетных структур типа «корзина» меньше, чем у рассмотренных ранее структур с латеральными пет-

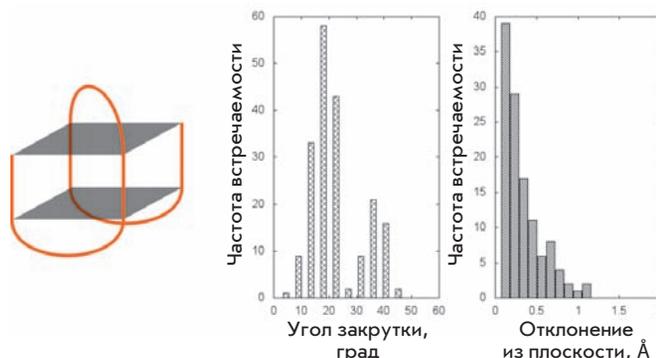


Рис. 7. Схема пространственной организации и геометрические характеристики четвертой группы структур.

лями, что, видимо, обусловлено уменьшением стэкинг-взаимодействий гетероциклических оснований диагональной петли с верхним квартетом.

Одномолекулярные параллельные квадруплексы с пропеллерными петлями

Состав группы:

- 1KF1 [24], 3CDM [55] – теломерная ДНК (человек);
- 1XAV [56], 2A5P [57], 1A5R [57] – промотор с-МҮС (человек);
- 2KQG [58], 2KQH [58], 2KYP [59] – промотор онкогена с-kit (человек);
- 1MYQ [60] – синтетический олигонуклеотид (GGA)₄;
- 1Y8D [61] – аптамер к интегразе ВИЧ-1.

Такие необычные структуры представляют собой внутримолекулярные квадруплексы, все петли которых представляют пропеллерный тип и полинуклеотидный тяж трижды меняет направление. Наличие пропеллерных петель жестко определяет структуру квадруплекса: распределение углов закручивания имеет выраженный максимум со значением $31^\circ \pm 3^\circ$ (рис. 8). Это значение близко к полученному для четырехтяжевых параллельных квадруплексов, у которых нет петель. Данный тип квадруплексов имеет планарные квартеты. Возможно, что пропеллерные петли обеспечивают оптимальную геометрию квадруплексов с жестко закрепленным сахарофосфатным остовом.

Бимолекулярные квадруплексы с латеральными петлями

Состав группы:

- 1A8N [62], 1A8W [63] – тандемный повтор GGGC;
- 1F3S [64] – синтетический олигонуклеотид.

В отличие от мономолекулярных квадруплексов, которые образуются путем внутримолекулярного фолдинга, бимолекулярные квадруплексы образуются при димеризации двух сложенных сами на себя полинуклеотидных тяжей, которые имеют блоки гуа-

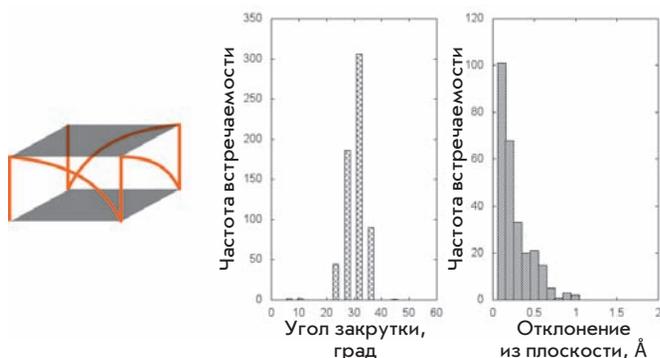


Рис. 8. Схема пространственной организации и геометрические характеристики пятой группы структур.

нинов. Представители данной группы квадруплексов отличаются сравнительно большой длиной латеральных петель (5–6 нуклеотидов). Их можно рассматривать как промежуточную группу между мономолекулярными квадруплексами с латеральными петлями и квадруплексами с диагональными петлями. Значения углов закручивания данных квадруплексов также показывают в пользу промежуточного положения этой группы – они находятся в области между двумя экстремумами, принадлежащими соседним группам (рис. 6, 7, 9). Можно отметить склонность рассматриваемых структур к закручиванию на $20^\circ \pm 1^\circ$ и 27° . Для более строгих заключений требуется большая статистическая значимость. Квартеты в квадруплексах данного типа очень планарны, по-видимому, из-за интенсивных стэкинг-взаимодействий с гетероциклическими основаниями петель.

Бимолекулярные квадруплексы с диагональными петлями

Состав группы:

- 156D [53, 65], 1JPQ [25], 1L1H [66], 1QDI [42], 1QDK [42], 3EM2 [67], 3EQW [67], 3ERU [67], 3ES0 [67], 3ET8 [67], 3EUM [67], 2AKG [68], 1K4X [53], 1JRN [25], 2HBN [69], 3EUI [67] – теломерная ДНК (*Oxytricha*);
- 2KAZ [70], 1U64 [71], 1LVS [72], 1FQP [73] – синтетические олигонуклеотиды.

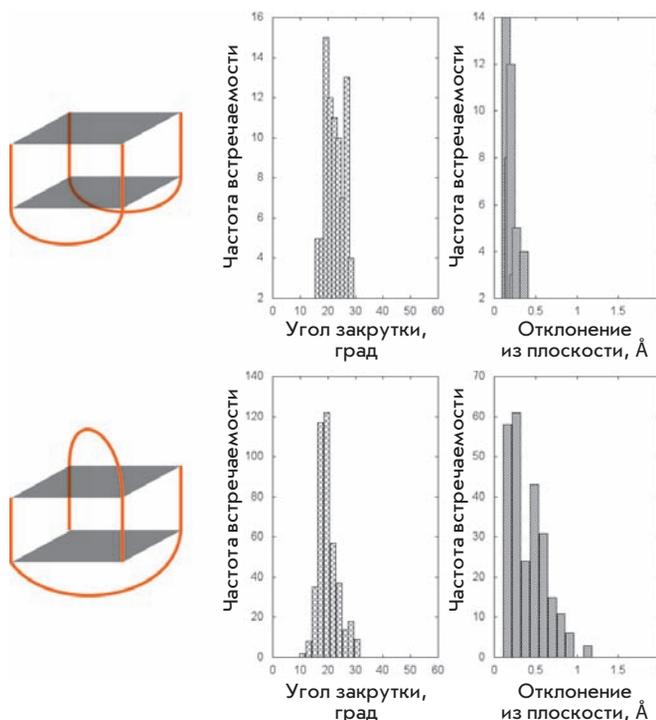


Рис. 9. Схема пространственной организации и геометрические характеристики шестой и седьмой групп структур.

Молекулы этой группы образуют бимолекулярные квадруплексы с диагональными петлями между противоположными углами квадруплекса. Таким образом, эти квадруплексы похожи на структуры типа «корзина», описанные ранее, у которых диагональная петля заменяет две латеральные петли. Для значительных углов закручивания квадруплексов такая замена приводит к исчезновению плеча с максимумом 35° , оставляя только один максимум $19^\circ \pm 4^\circ$ (рис. 9). Распределение значений планарности квартетов также похоже на таковое у структур типа «корзина».

Бимолекулярные параллельные квадруплексы с пропеллерными петлями

Состав группы:

- 1K8P [24], 2HRI [74], 3SE5 [75] – теломерная ДНК (человек); 2KY0 [59] – промотор онкогена *c-kit* (человек);
- 1NYD [76], 1EEG [77], 1XSE [78] – синтетические олигонуклеотиды.

Для данного типа квадруплекса, как и для его мономолекулярного аналога, пропеллерные петли жестко ограничивают конформационный полиморфизм квадруплекса: распределение значений угла закручивания имеет максимум при $31^\circ \pm 3^\circ$; квартеты планарны (рис. 10).

Классификация квадруплексных структур

G-квадруплексные структуры локализованы на концах теломерных участков ДНК и промоторах ряда онкогенных и ассоциированных с раком генов. Это делает квадруплексы привлекательной мишенью для антираковой химиотерапии. Наиболее предпочтительной моделью взаимодействия антираковых агентов с квадруплексной ДНК являются стэкинг-взаимодействия с квартетами (терминальными либо за счет интеркаляции), с одной стороны, и взаимодействия с бороздками – с другой. Таким образом, детальное знание гео-

метрии этих элементов и причин, способных влиять на нее, является необходимым при рациональном поиске новых эффективных антираковых агентов.

Квадруплексы нуклеиновых кислот представляют интерес не только как мишени антионкогенных препаратов, но и как структурное ядро терапевтических агентов на основе аптамеров. В частности, это аптамеры к тромбину, к ВИЧ-1-интегразе, к опухолевому маркеру – белку нуклеолину, вовлеченному в процессинг РНК. Для оптимизации стабильности и эффективной самосборки этих олигонуклеотидов также необходимо знать природу сил, способных оказывать стабилизирующее и дестабилизирующее воздействие на молекулу аптамера.

Для квадруплексов характерно большое топологическое и структурное разнообразие, обусловленное такими переменными, как количество G-квартетов, направленность, тип, последовательность и длина петель. Для описания этого конформационного ансамбля мы выбрали два параметра – угол закручивания между двумя соседними квартетами и планарность квартетов.

Как показано в нашей работе, эти параметры успешно характеризуют самые сложные квадруплексные структуры. Надо отметить, что под параметром «планарность» мы подразумеваем обобщение двух явлений. В случае, если квартет симметричный и все гуанины образуют водородные связи друг с другом, этим параметром фиксируется именно планарность квартета. В случае разрыва водородных связей симметрия квартета нарушается, и параметр фиксирует степень искажения квартета.

Четырехтяжевой межмолекулярный параллельный квадруплекс является простейшим случаем, в котором имеет место лишь одна из указанных переменных – количество G-квартетов. Эта переменная определяет границы, в которых могут существовать такие структуры без ущерба для своей целостности. Границы довольно широки, в терминах угла закручивания они составляют 19° – 36° , с двумя областями предпочтительных значений: 21° и 27° – 34° . Движения терминальных квартетов таких структур ограничены лишь стэкинг-взаимодействиями с прилежащими квартетами и координационными связями со стабилизирующими катионами в случае их наличия. Таким образом, G-квартеты таких структур, особенно терминальные, не отличаются ярко выраженной планарностью.

Структуры типа «кресло» разительным образом отличаются от четырехтяжевых квадруплексов, в составе которых нет петель. Латеральные петли таких структур ограничивают геометрию квадруплексов, более того, они уводят ее в область значений углов закручивания, не свойственных беспетлевым квадруплексам. Если для последних минимальные углы

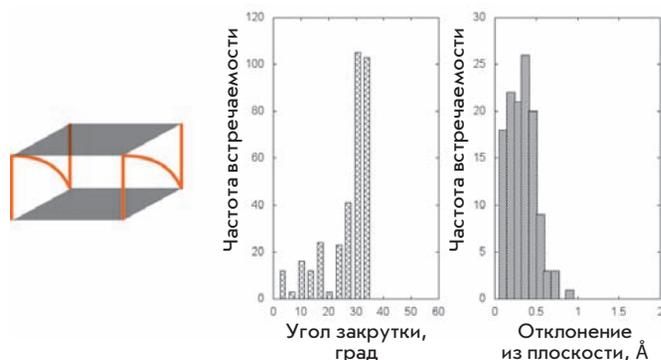


Рис. 10. Схема пространственной организации и геометрические характеристики восьмой группы структур.

составляют 19° , то для структур с петлями исключительно латерального типа область предпочтительных значений заключается в промежутке $15^\circ \pm 5^\circ$. Это говорит о том, что латеральные петли, в основном из-за небольшой длины, привносят в структуру квадруплекса существенные напряжения. В то же время из-за особенностей расположения, вытекающих из названия данного типа петель, на терминальных полюсах G-квадруплексов такие петли активно взаимодействуют с конечными квартетами квадруплексов за счет образования стэкинг-взаимодействий, что положительно сказывается на планарности квартетов структур типа «кресло».

Интересным является тот факт, что добавление петель диагонального или пропеллерного типа к структуре типа «кресло» существенно сказывается на паттерне распределения углов закручивания. Происходит сдвигание предпочтительной области значений углов в сторону больших величин, уже характерных для беспетлевых параллельных G-квадруплексов. В добавление к этому на паттерне появляется второе плечо, характеризующее область, примыкающую к петле отличного от латерального типа.

В структурах типа «корзина» хорошо видно, насколько велико напряжение, создаваемое латеральными петлями, располагающимися с одного полюса молекулы. Момент, создаваемый этими силами, разворачивает прилегающую к диагональной петле область молекулы в область углов закручивания, составляющих $36^\circ \pm 4^\circ$. Это выше допустимой нормы для беспетлевых параллельных квадруплексов, но диагональная петля за счет своей длины и эластичности компенсирует эту аномалию. Необходимо отметить, что такие значения углов закручивания не характерны для структур с петлями исключительно диагонального типа. В таких структурах геометрия квадруплексов довольно жестко ограничена значениями углов $19^\circ \pm 4^\circ$, что все же ближе к приемлемым для беспетлевых квадруплексов значениям. Таким образом, можно заключить, что напряжения, создаваемые латеральными петлями, сильнее создаваемых петлями диагонального типа. Интересно отметить, что часто используемый в описании квадруплексов паттерн *син/анти*-конформаций в группе бимолекулярных квадруплексов с диагональными петлями представлен наибольшим количеством ком-

бинаций. В то же время в этой группе наименьший разброс углов закручивания квадруплексов. Это наблюдение позволяет предположить, что доминирующим фактором влияния на структуру квадруплекса является тип петель.

Пропеллерные петли наиболее жестко определяют геометрию квадруплекса. Как в одномолекулярных, так и в бимолекулярных тетраплексах с петлями исключительно пропеллерного типа значения углов закручивания колеблются в пределах $31^\circ \pm 3^\circ$. Даже добавление к таким структурам латеральных петель слабо сказывается на закручивании прилежащих к пропеллерным петлям областей – оно характеризуется областью $28^\circ \pm 4^\circ$. Эти характеристики вписываются во вторую область предпочтительных значений для беспетлевых квадруплексов (27° – 34°). Видимо, такие углы закручивания соответствуют оптимальной геометрии G-квартета, поскольку тетрады структур с петлями пропеллерного типа отличаются высокой планарностью, в отличие от квадруплексов с диагональными петлями.

ВЫВОДЫ

В данной работе исследованы все известные на данный момент G-квадруплексные структуры. Эти структуры кластеризуются не только по топологии; многие группы представлены последовательностями с общим или родственным происхождением. Следует заметить, что в итоговое рассмотрение включены не все структуры – часть обладает слишком специфичной топологией, чтобы составить представительную выборку. Для описания геометрии квадруплексов мы предложили два параметра: угол закручивания тетраплекса и степень планарности G-тетрад. Мы показали, что основным источником напряжений в структуре квадруплексов являются петли, соединяющие блоки G-тяжей. Петли латерального типа наиболее сильно изменяют геометрию G-квадруплексов, однако их воздействие компенсируется добавлением в структуру петель диагонального и пропеллерного типа. Петли диагонального типа также достаточно жестко определяют структуру квадруплекса, однако создаваемые ими напряжения не столь велики, как в случае с латеральными петлями. Оптимальной же геометрией характеризуются квадруплексы с петлями пропеллерного типа. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gellert M., Lipsett M., Davies D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1962. V. 48. P. 2013–2018.
- Arnott S., Chandrasekaran R., Marttila C.M. // Biochem. J. 1974. V. 141. P. 537–543.
- Zimmerman S. // J. Mol. Biol. 1976. V. 106. P. 663–672.
- Simonsson T. // Biol. Chem. 2001. V. 382. P. 621–628.

- De Lange T. // Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 2005. V. 70. P. 197–204.
- Wright W.E., Tesmer V.M., Huffman K.E., Levene S.D., Shay J.W. // Genes Dev. 1997. V. 11. P. 2801–2809.
- Lei M., Podell E.R., Cech T.R. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2004. V. 11. P. 1223–1229.
- Sen D., Gilbert W. // Nature. 1988. V. 334. P. 364–366.

9. Sundquist W.I., Klug A. // *Nature*. 1989. V. 342. P. 825–829.
10. Gilbert D.E., Feigon J. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1999. V. 9. P. 305–314.
11. Cogoi S., Xodo L.E. // *Nucleic Acids Res.* 2006. V. 34. P. 2536–2549.
12. Rankin S., Reszka A.P., Huppert J., Zloh M., Parkinson G.N., Todd A.K., Ladame S., Balasubramanian S., Neidle S. // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. V. 127. P. 10584–10589.
13. Dexheimer T.S., Sun D., Hurley L.H. // *J. Am. Chem. Soc.* 2006. V. 128. P. 5404–5415.
14. Siddiqui-Jain A., Grand C.L., Bearss D.J., Hurley L.H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. P. 11593–11598.
15. Hurley L.H., von Hoff D.D., Siddiqui-Jain A., Yang D. // *Semin. Oncol.* 2006. V. 33. P. 498–512.
16. Nimjee S.M., Rusconi C.P., Sullenger B.A. // *Annu. Rev. Med.* 2005. V. 56. P. 555–583.
17. Shamah S.M., Healy J.M., Cload S.T. // *Acc. Chem. Res.* 2008. V. 41. P. 130–138.
18. Bock L.C., Griffin L.C., Latham J.A., Vermaas E.H., Toole J.J. // *Nature*. 1992. V. 355. P. 564–566.
19. Jing N., Zhu Q., Yuan P., Li Y., Mao L., Tweardy D.J. // *Mol. Cancer Ther.* 2006. V. 5. P. 279–286.
20. McMicken H.W., Bates P.J., Chen Y. // *Cancer Gene Ther.* 2003. V. 10. P. 867–869.
21. Jayapal P., Mayer G., Heckel A., Wennmohs F. // *J. Struct. Biol.* 2009. V. 166. P. 241–250.
22. Lim K.W., Alberti P., Guédin A., Lacroix L., Riou J., Royle N.J., Mergny J., Phan A.T. // *Nucl. Acids Res.* 2009. V. 37. P. 6239–6248.
23. Wang Y., Patel D. // *Structure*. 1993. V. 1. P. 263–282.
24. Parkinson G.N., Lee M.P.H., Neidle S. // *Nature*. 2002. V. 417. P. 876–880.
25. Haider S., Parkinson G.N., Neidle S. // *J. Mol. Biol.* 2002. V. 320. P. 189–200.
26. Horvath M.P., Schultz S.C. // *J. Mol. Biol.* 2001. V. 310. P. 367–377.
27. Phillips K., Dauter Z., Murchie A., Lilley D., Luisi B. // *J. Mol. Biol.* 1997. V. 273. P. 171–182.
28. Hud N.V., Smith F.W., Anet F.A., Feigon J. // *Biochemistry*. 1996. V. 35. P. 15383–15390.
29. Kankia B.I., Marky L.A. // *J. Am. Chem. Soc.* 2001. V. 123. P. 10799–10804.
30. Deng J., Xiong Y., Sundaralingam M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 8. P. 13665–13670.
31. el Hassan M.A., Calladine C.R. // *J. Mol. Biol.* 1995. V. 251. P. 648–664.
32. Reshetnikov R., Golovin A., Spiridonova V., Kopylov A., Šponer J. // *J. Chem. Theory Comput.* 2010. V. 6. P. 3003–3014.
33. Patel P.K., Koti A.S., Hosur R.V. // *Nucl. Acids Res.* 1999. V. 27. P. 3836–3843.
34. Gavathiotis E., Searle M.S. // *Org. Biomol. Chem.* 2003. V. 1. P. 1650–1656.
35. Gavathiotis E., Heald R.A., Stevens M.F.G., Searle M.S. // *J. Mol. Biol.* 2003. V. 334. P. 25–36.
36. Clark G.R., Pytel P.D., Squire C.J., Neidle S. // *J. Am. Chem. Soc.* 2003. V. 125. P. 4066–4067.
37. Wang Y., Patel D. // *Biochemistry*. 1992. V. 31. P. 8112–8119.
38. Patel P.K., Hosur R.V. // *Nucleic Acids Res.* 1999. V. 27. P. 2457–2464.
39. Patel P.K., Bhavesh N.S., Hosur R.V. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000. V. 270. P. 967–971.
40. Schultze P., Macaya R.F., Feigon J. // *J. Mol. Biol.* 1994. V. 235. P. 1532–1547.
41. Marathias V.M., Bolton P.H. // *Nucleic Acids Res.* 2000. V. 28. P. 1969–1977.
42. Marathias V.M., Wang K.Y., Kumar S., Pham T.Q., Swaminathan S., Bolton P.H. // *J. Mol. Biol.* 1996. V. 260. P. 378–394.
43. Mao X., Marky L.A., Gmeiner W.H. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2004. V. 22. P. 25–33.
44. Phan A.T., Kuryavyy V., Luu K.N., Patel D.J. // *Nucleic Acids Res.* 2007. V. 35. P. 6517–6525.
45. Wang Y., Patel D.J. // *Structure*. 1994. V. 2. P. 1141–1156.
46. Luu K.N., Phan A.T., Kuryavyy V., Lacroix L., Patel D.J. // *J. Am. Chem. Soc.* 2006. V. 128. P. 9963–9970.
47. Dai J., Punchedihewa C., Ambrus A., Chen D., Jones R.A., Yang D. // *Nucl. Acids Res.* 2007. V. 35. P. 2440–2450.
48. Dai J., Carver M., Punchedihewa C., Jones R.A., Yang D. // *Nucl. Acids Res.* 2007. V. 35. P. 4927–4940.
49. Dai J., Chen D., Jones R.A., Hurley L.H., Yang D. // *Nucl. Acids Res.* 2006. V. 34. P. 5133–5144.
50. Lim K.W., Amrane S., Bouaziz S., Xu W., Mu Y., Patel D.J., Luu K.N., Phan A.T. // *J. Am. Chem. Soc.* 2009. V. 131. P. 4301–4309.
51. Zhang Z., Dai J., Veliath E., Jones R.A., Yang D. // *Nucl. Acids Res.* 2010. V. 38. P. 1009–1021.
52. Hu L., Lim K.W., Bouaziz S., Phan A.T. // *J. Am. Chem. Soc.* 2009. V. 131. P. 16824–16831.
53. Smith F., Feigon J. // *Nature*. 1992. V. 356. P. 164–168.
54. Wang Y., Patel D.J. // *J. Mol. Biol.* 1995. V. 251. P. 76–94.
55. Parkinson G.N., Cuenca F., Neidle S. // *J. Mol. Biol.* 2008. V. 381. P. 1145–1156.
56. Ambrus A., Chen D., Dai J., Jones R.A., Yang D. // *Biochemistry*. 2005. V. 44. P. 2048–2058.
57. Phan A.T., Kuryavyy V., Gaw H.Y., Patel D.J. // *Nat. Chem. Biol.* 2005. V. 1. P. 167–173.
58. Hsu S.D., Varnai P., Bugaut A., Reszka A.P., Neidle S., Balasubramanian S. // *J. Am. Chem. Soc.* 2009. V. 131. P. 13399–13409.
59. Kuryavyy V., Phan A.T., Patel D.J. // *Nucl. Acids Res.* 2010. doi: 10.1093/nar/gkq558.
60. Matsugami A., Ouhashi K., Kanagawa M., Liu H., Kanagawa S., Uesugi S., Katahira M. // *J. Mol. Biol.* 2001. V. 313. P. 255–269.
61. Phan A.T., Kuryavyy V., Ma J., Faure A., Andréola M., Patel D.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. P. 634–639.
62. Kettani A., Bouaziz S., Gorin A., Zhao H., Jones R.A., Patel D.J. // *J. Mol. Biol.* 1998. V. 282. P. 619–636.
63. Bouaziz S., Kettani A., Patel D.J. // *J. Mol. Biol.* 1998. V. 282. P. 637–652.
64. Kettani A., Basu G., Gorin A., Majumdar A., Skripkin E., Patel D.J. // *J. Mol. Biol.* 2000. V. 301. P. 129–146.
65. Smith F., Feigon J. // *Biochemistry*. 1993. V. 32. P. 8682–8692.
66. Haider S.M., Parkinson G.N., Neidle S. // *J. Mol. Biol.* 2003. V. 326. P. 117–125.
67. Campbell N.H., Patel M., Tofa A.B., Ghosh R., Parkinson G.N., Neidle S. // *Biochemistry*. 2009. V. 48. P. 1675–1680.
68. Gill M.L., Strobel S.A., Loria J.P. // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. V. 127. P. 16723–16732.
69. Gill M.L., Strobel S.A., Loria J.P. // *Nucleic Acids Res.* 2006. V. 34. P. 4506–4514.
70. Balkwill G.D., Garner T.P., Williams H.E.L., Searle M.S. // *J. Mol. Biol.* 2009. V. 385. P. 1600–1615.
71. Sket P., Crnugelj M., Plavec J. // *Bioorg. Med. Chem.* 2004. V. 12. P. 5735–5744.
72. Crnugelj M., Hud N.V., Plavec J. // *J. Mol. Biol.* 2002. V. 320. P. 911–924.
73. Keniry M.A., Strahan G.D., Owen E.A., Shafer R.H. // *Eur. J. Biochem.* 1995. V. 233. P. 631–643.
74. Parkinson G.N., Ghosh R., Neidle S. // *Biochemistry*. 2007. V. 46. P. 2390–2397.
75. Campbell N.H., Parkinson G.N., Reszka A.P., Neidle S. // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. V. 130. P. 6722–6724.
76. Webba da Silva M. // *Biochemistry*. 2003. V. 42. P. 14356–14365.
77. Kettani A., Gorin A., Majumdar A., Hermann T., Skripkin E., Zhao H., Jones R., Patel D.J. // *J. Mol. Biol.* 2000. V. 297. P. 627–644.
78. Webba da Silva M. // *Biochemistry*. 2005. V. 44. P. 3754–3764.

УДК 577.152.1

Биофармакология ферментных конъюгатов: вазопротекторная активность супрамолекулярного производного супероксиддисмутаза-хондроитинсульфат-каталаза

А. В. Максименко*, А. В. Ваваев, Л. И. Бурячковская, В. П. Мох, И. А. Учитель, В. Л. Лакомкин, В. И. Капелько, Е. Г. Тищенко

Институт экспериментальной кардиологии, Российский кардиологический научно-производственный комплекс Минздравсоцразвития, 121552, Москва,

3-я Черепковская ул., 15А

* E-mail: alexmak@cardio.ru

Поступила в редакцию 07.10.2010 г.

РЕФЕРАТ Показано, что биферментный конъюгат супероксиддисмутаза с каталазой, ковалентно сопряженных друг с другом через хондроитинсульфат – гликозаминогликан эндотелиального гликокаликса (СОД-ХС-КАТ) – обладает вазопротекторной активностью при взаимодействии с тромбоцитами и кольцевым артериальным фрагментом сосуда крысы, а также при нормализации показателей гемодинамики крыс и кроликов в условиях окислительного стресса, вызванного введением пероксида водорода. Биферментный конъюгат СОД-ХС-КАТ угнетал агрегацию тромбоцитов; антиагрегантное действие проявлялось благодаря комбинированной ферментативной активности и приобретенной надмолекулярной структуре. Влияние на тонус артериального фрагмента было эквивалентным для СОД и КАТ в нативном и сопряженном виде. Эффективность нормализующего действия конъюгата СОД-ХС-КАТ на величины артериального давления и частоты сердечных сокращений у крыс и кроликов была достоверно выше соответствующих показателей в контрольных опытах (введение физиологического раствора). Обнаружена возможность использования конъюгата СОД-ХС-КАТ в хроническом профилактическом режиме и обоснована целесообразность разработки его пероральных форм. Мы предполагаем, что разработка ферментных конъюгатов медицинского назначения является перспективным подходом для создания новых лекарственных препаратов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА антиоксидантная терапия, супероксиддисмутаза, каталаза, хондроитинсульфат, сосудистая стенка, окислительный стресс, пероксид водорода, биферментный конъюгат, тромбоциты, артериальный фрагмент, гемодинамика, вазопротекторная активность.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ СОД – супероксиддисмутаза; КАТ – каталаза; ХС – хондроитинсульфат; СОД-ХС-КАТ – биферментный конъюгат супероксиддисмутаза-хондроитинсульфат-каталаза; АФК – активные формы кислорода; L-NNA – N_ω-нитро-L-аргинин; SNP – нитропруссид натрия; ADP – аденозиндифосфат; TRAP – пептидный агонист тромбинового рецептора; NA – норадреналин; АД – среднее артериальное давление; ЧСС – частота сердечных сокращений; ЭКГ – электрокардиограмма; ОТП – обогащенная тромбоцитами плазма.

ВВЕДЕНИЕ

В тромболитической терапии в качестве лекарств широко используются ферменты [1, 2]. Известны и «золотая» молекула фибринолиза, и «золотое» время тромболитизиса, расширяется арсенал биокатализаторов, предназначенных для него [3, 4]. Вместе с тем ресурс терапевтического применения ферментов не исчерпан и ведется поиск их новых форм для оригинальных курсов лечения разных патологий [5, 6].

Сегодня общеизвестно, что развитие многих патологий сопровождается окислительным стрессом [7, 8]. В состоянии нормы активные формы кислорода (АФК) участвуют в процессах клеточного сигналинга, а при нарушении окислительно-антиоксидантного равновесия в сторону избыточного образования АФК – в развитии окислительного стресса. Избыток АФК в организме вызывает модификацию макромолекул, нарушение путей метаболизма и прогрессиру-

вание патологических процессов [9], предотвращению и замедлению которых служит превентивное использование антиоксидантов [10]. Среди них по высокой эффективности своего защитного действия, специфичности и установленному механизму катализируемых реакций выделяются ферменты [11]. Развитие подавляющего большинства сердечно-сосудистых нарушений включает фазу окислительного стресса. Поэтому в кардиологии исследования антиоксидантов проводятся особенно интенсивно.

К антиоксидантным ферментам организма в настоящее время относят супероксиддисмутазу, каталазу, глутатионпероксидазу [9–11]. Автономность функционирования двух первых делает их привлекательным объектом для разработки антиоксидантного препарата для защиты сердечно-сосудистой системы от окислительного стресса. Основываясь на указанных преимуществах, мы выбрали Cu,Zn-супероксиддисмутазу (СОД) и каталазу (КАТ) в целях создания комбинированного ферментного антиоксидантного производного.

Наш подход опирался на использование биохимически сопряженного действия СОД и КАТ, когда продукт первого ферментативного (СОД) превращения (H_2O_2) становится субстратом для второго (КАТ) с образованием безопасных в этих условиях конечных продуктов – воды и молекулярного кислорода [9, 11]. Накопление гликозаминогликана эндотелиального гликокаликса – хондроитинсульфата (ХС) – в зонах начальных атеросклеротических изменений сосудов (т.е. в очагах потенциального развития поражения сосудистой стенки) [12] явилось основанием для использования ХС в качестве «сшивающего» агента-модификатора для ферментных субъединиц [13]. Водорастворимая форма полученного экзогенного биферментного конъюгата СОД-ХС-КАТ позволяла осуществлять как внутривенное, так и пероральное введение. Следует отметить, что линейные размеры молекулы КАТ составляют $10.5 \times 10.5 \times 5.0$ нм [14], а СОД – $6.7 \times 3.6 \times 3.3$ нм [15]. Полимерная цепь ХС (мол. масса 25–50 кДа) «опутывает» поверхность ферментных субъединиц, соединяя их друг с другом в ковалентный конъюгат [16]. Указанная природа соединения ферментных субъединиц подтверждается данными денатурирующего электрофореза [13, 16] и наибольшей антитромботической активностью *in vivo* биферментного конъюгата в ряду различных сочетаний составляющих его компонентов, что обуславливает его оптимальное внутрисосудистое распределение и наилучшую эффективность действия [17]. По молекулярным размерам конъюгат входит в нижнюю часть нанощкалы, превращаясь в наночастицу (с ориентировочными размерами $(17-20) \times (14-18) \times (8-12)$ нм). Полагают, что физи-

ческие, химические и биологические свойства молекулярных объектов, имеющих наноразмеры, могут приобретать уникальный, а иногда и неожиданный характер по сравнению со свойствами их компонентов, в частности, из-за квантово-механических эффектов, привносимых образованными структурами.

Рассматривая надмолекулярный конъюгат СОД-ХС-КАТ как биферментное устройство с размерами наночастицы, в данной работе мы исследовали взаимодействие конъюгата с тромбоцитами (как происходящим в объеме кровотока) и с кольцевым артериальным фрагментом (как осуществляемым на поверхности сосудистой стенки), а также на уровне целого организма экспериментальных животных как в условиях окислительного стресса, моделируемого введением пероксида водорода, так и без него.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы

В исследовании были использованы препараты Cu,Zn-супероксиддисмутазы (СОД), выделенной из бычьих эритроцитов, со специфической активностью 3000 Ед/мг белка; каталазы (КАТ) из печени быка со специфической активностью 11000 Ед/мг белка; хондроитин-4-сульфат А (мол. масса 25–50 кДа) из трахеи быка; бензохинон, диметилформамид, β -галактозидаза (из *Escherichia coli*), ксантин, пероксид водорода, норадреналин, N_{ω} -нитро-L-аргинин (L-NNA), ацетилхолин, нитропруссид натрия (SNP) (все – Sigma, США). Ксантинооксидаза была приобретена в Calbiochem (США), нитротетразолий синий – в Реанал (Венгрия), сефадекс G-25 и сефакрил S-300 – в Pharmacia (Швеция). Остальные реагенты – аналитически чистые вещества отечественного производства.

Получение биферментного производного СОД-ХС-КАТ проводили описанным ранее способом [16]. Весовое содержание белка в препарате СОД-ХС-КАТ составляло 4–6%, удельная (специфическая) активность СОД составляла 60 Ед/мг препарата, КАТ – 140 Ед/мг препарата. Приготовление конъюгата СОД-ХС-КАТ с необратимо инактивированными формами ферментов осуществляли с предварительной инактивацией СОД и КАТ после их инкубации с 0.3 М раствором пероксида водорода (рН 7.0, 0.02 М фосфатный буфер, комнатная температура, 3 ч) и при рН 11.8–12.0 (0.05 М NaOH, комнатная температура, 2 ч) соответственно [16].

Методы

Биохимические определения. Содержание белка в препаратах определялось по методу Бредфорд. Ферментативную активность СОД измеряли по ин-

гибированию восстановления нитротетразолия синего в системе ксантин-ксантиоксидаза, рН 7.8 [13], а КАТ – спектрофотометрически по уменьшению поглощения (расход пероксида водорода) при длине волны 240 нм (рН 7.0, комнатная температура) [16].

Изучение агрегации тромбоцитов. Для изучения влияния пероксида водорода и СОД-ХС-КАТ на агрегацию тромбоцитов использовали кровь здоровых добровольцев, которую получали самотеком из кубитальной вены натошак, собирая в пластиковую пробирку с 0.13 М цитратом натрия (рН 7.3). Обогащенную тромбоцитами плазму (ОТП) выделяли центрифугированием крови при 180 *g* в течение 15 мин. Агрегацию тромбоцитов оценивали с помощью лазерного двухканального анализатора агрегации БИОЛА (модель LA 230-2, фирма НПФ Биола, Россия). Кроме традиционного метода регистрации светопропускания (метод Борна), агрегация тромбоцитов оценивалась на основании анализа флуктуаций светового потока, проходящего через образец. Относительная дисперсия таких флуктуаций пропорциональна среднему радиусу агрегатов и позволяет исследовать образование микроагрегатов, содержащих менее 100 тромбоцитов, а также устранять влияние светопоглощающей активности плазмы и процесса изменения формы тромбоцитов на точность регистрации, что особенно важно для исследования спонтанной агрегации.

Способность к образованию агрегатов малого размера (от 3 до 100 клеток) изучали по агрегации – спонтанной и индуцированной 0.5 мкМ аденозиндифосфата (ADP), 0.5 мкМ серотонина и 1 мкМ TRAP (пептидный агонист тромбинового рецептора) с помощью метода регистрации среднего размера агрегатов (в отн. ед.). Образование агрегатов большого размера (свыше 100 клеток) в ответ на 5 мкМ ADP и 6 мкМ TRAP оценивали по Борну в % светопропускания. Объем кюветы агрегометра – 0.3 мл. Исследование проводили не позднее 2 ч после взятия крови.

Адгезию оценивали с помощью сканирующей электронной микроскопии. Пробу ОТП (15 мкл) смешивали с физиологическим раствором, H₂O₂ и/или препаратами каталазы и наносили на адгезивную поверхность (стекло), инкубировали 15 мин при комнатной температуре в закрытом бюксе для предотвращения высыхания, осторожно отмывали в физиологическом растворе, чтобы снять неприкрепленные клетки, и фиксировали в 2.5% глутаровом альдегиде 1.5 ч. По окончании фиксации образец обезжизивали и готовили для микроскопии.

Подсчет тромбоцитов различной формы осуществляли на 25 полях сканирования при увеличении 2500х на сканирующем электронном микроскопе

PHILLIPS PSEM 550х и выражали в процентах от общего количества клеток.

Исследование изменений тонуса кольцевого артериального фрагмента крыс. После декапитации крыс линии Wistar (самцы массой 350–400 г) вскрывалась брюшная полость и выделялась брюшная аорта. Удаленный сегмент аорты тщательно очищался от соединительной ткани и нарезался на кольцевые фрагменты длиной 3 мм. Фрагменты аорты, надетые на иголки, соединенные с тензодатчиком (определяющим силовое усилие, производимое в системе артериальным фрагментом, в мН), погружались в раствор Кребса–Хэнсиляита и продувались карбогеном при 37°C и рН 7.4 [18]. Окислительный стресс моделировали введением в инкубационный раствор пероксида водорода на фоне норадrenalиновой (NA) преко́нстрикции (предварительного сокращения артериального фрагмента на введение норадrenalина перед введением другого стимула). Изменение тонуса сосуда оценивалось относительно величины сокращения на 0.1 мкМ NA, принятой за 100%. Производные антиоксидантных ферментов в разных концентрациях вводили за 10 мин до введения пероксида водорода. Влияние СОД (10 Ед/мл) на тонус артериального фрагмента определяли введением нативной СОД или СОД-ХС-КАТ на фоне NA-преко́нстрикции. Продукция эндогенного NO и его влияние на тонус кольцевого артериального фрагмента проверялись введением экзогенного ингибитора NO-синтазы L-NNA (0.1 мкМ).

Эксперименты in vivo. Переносимость и защитное действие производного СОД-ХС-КАТ в условиях окислительного стресса, вызванного внутривенным введением пероксида водорода, были изучены на самцах кроликов (*n* = 29) весом 3.65 ± 0.10 кг и самцах крыс линии Wistar (*n* = 13) весом 427 ± 7 г. Все эксперименты проводились на животных, анестезированных кетаминном.

Кроликам под кетаминным наркозом (50–60 мг/кг веса) с помощью игл, вклеенных в катетер (диаметром PE-50), катетеризировали центральную артерию одного уха и краевые вены левого и правого уха. После вводного наркоза (55 мк/кг) 5% кетамин продолжали вводить инфузией с помощью шприцевого насоса (SAGE Instruments, США) со скоростью 36–54 мкл/ч на 1 кг живого веса кролика. В вену другого уха болюсно вводили физиологический раствор или раствор производного СОД-ХС-КАТ, а также 0.8% раствор пероксида водорода, инфузией со скоростью 0.4 мл/мин в течение 3 мин 2 раза с перерывом в 20 мин, необходимого для полного восстановления параметров после первого введения пероксида

водорода и распределения внутривенно введенного конъюгата в организме. В остром опыте введение реagens проводили в следующем порядке: пероксид водорода – физиологический раствор (контрольная группа) или СОД-ХС-КАТ (опытная или опытно-профилактическая группа) – пероксид водорода. Регистрация среднего артериального давления (АД), частоты сердечных сокращений (ЧСС) и электрокардиограммы (ЭКГ) во втором отведении проводилась на приборе BIOGRAF-4 (Санкт-Петербургский государственный университет аэрокосмического приборостроения, Россия) с компьютеризированной записью данных с помощью АЦП платы NI 6210 (National Instruments, США) и их последующей обработкой с помощью программы анализа физиологических сигналов (Е.В. Лукошкова). После регистрации исходных параметров АД, ЧСС, ЭКГ (в течение 15 мин) прово-

дили 3-мин введение пероксида водорода с последующей 10-мин записью показателей АД, ЧСС и ЭКГ. Суммарная доза пероксида водорода, полученная животным за весь период эксперимента, составляла 0.31 мкмоль/кг. В контрольной группе $n = 12$, в опытных группах $n = 15$.

Крысам линии Wistar под кетаминным наркозом (100 мг/кг) вживляли катетеры (диаметром РЕ-50) в сонную артерию и яремную вену. Протокол эксперимента был таким же, как и ранее описанный, за исключением одного: пероксид водорода вводили на 2 мин дольше, чтобы получить сходные эффекты на параметры гемодинамики. Суммарная доза пероксида водорода, полученная крысами за весь период эксперимента, составила 4.5 мкмоль/кг. После проведенных экспериментов все животные оставались живы.

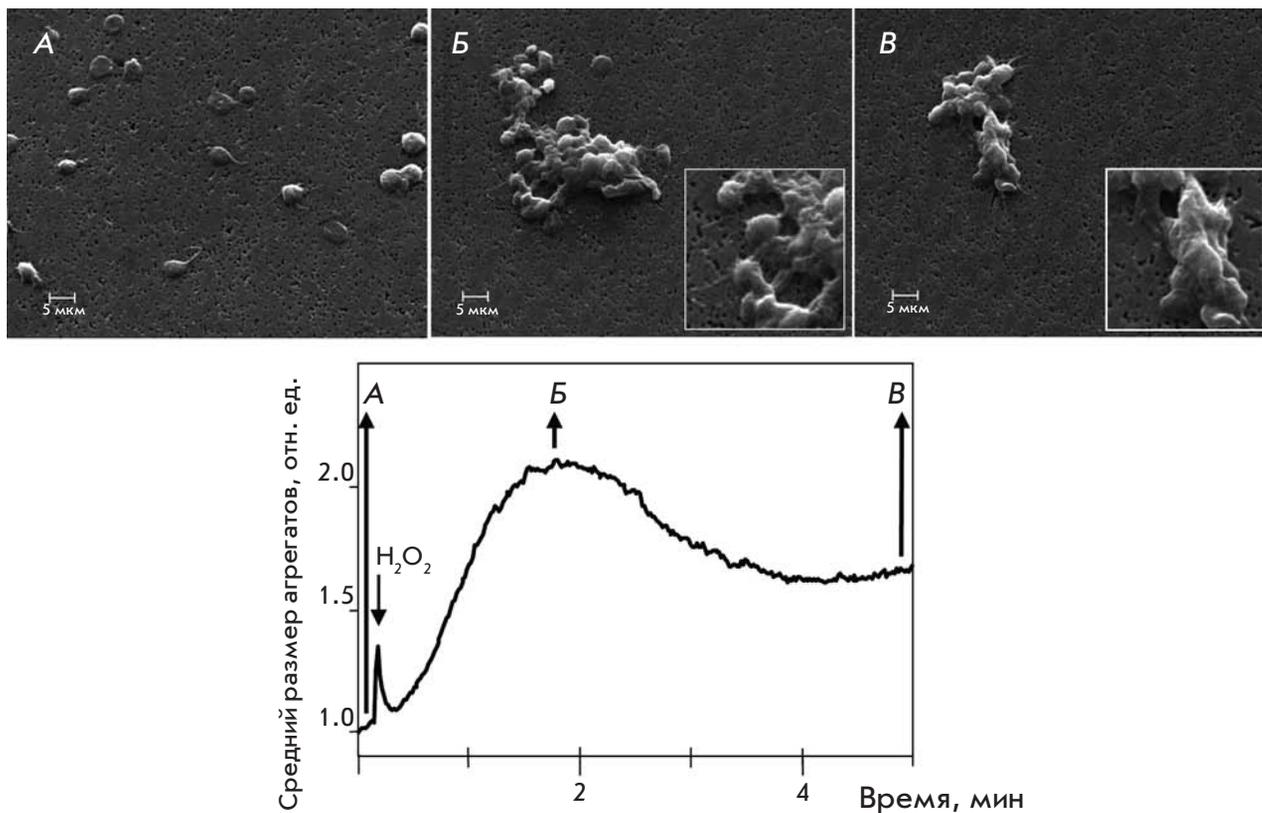


Рис. 1. Агрегация тромбоцитов, индуцированная 600 мкМ H_2O_2 . Микрофотографии А–В показывают состав тромбоцитарных агрегатов на разных стадиях их образования, график внизу иллюстрирует динамику агрегации тромбоцитов. А – Одиночные тромбоциты до начала агрегации в основном имеют дисковидную форму. Б – Образец, взятый на пике агрегации; агрегаты с плотным ядром в центре и слабо прикрепленными тромбоцитами по периферии (рыхлость структуры периферической области в увеличенном виде показана на вставке). В – Образец взят на 5-й мин агрегации; размер агрегатов уменьшился, по периферии отсутствуют слабо прикрепленные тромбоциты; при большем увеличении на вставке видно слияние тромбоцитов в агрегате. Увеличение 2500х, на вставках 5000х.

В отдельной серии экспериментов на кроликах ($n = 8$) исследовали переносимость производного СОД-ХС-КАТ по влиянию разных доз (терапевтической 1.5 мг препарата на 1 кг веса животного, а также 7.5 и 15 мг/кг) на среднее АД и ЧСС, как и на ЭКГ. После 15 мин контрольной регистрации АД, ЧСС (принятых за 100%) и ЭКГ вводили первую дозу производного СОД-ХС-КАТ (1.5 мг/кг) и записывали в течение 15 мин АД, ЧСС и ЭКГ, затем вводили следующую дозу СОД-ХС-КАТ (7.5 мг/кг) и через 20 мин – другую (15 мг/кг), в 10 раз превышающую терапевтическую, с записью гемодинамических параметров и ЭКГ. Животные, получившие суммарно 16-кратную терапевтическую дозу производного СОД-ХС-КАТ, через 3 сут использовались для оценки профилактического действия биферментного конъюгата при окислительном стрессе (как это описано выше) в сравнении с эффектами его острого применения и контрольного эксперимента на интактных кроликах, которым предварительно ничего не вводили.

Определение статистически значимых различий. Полученные результаты представлены как среднее значение \pm ошибка среднего ($\pm SE$, n – количество животных). Сравнение двух групп проводили с применением двухстороннего критерия Стьюдента (статистическая значимость различий оценивалась при $p < 0.01$). Если групп сравнения было более двух, статистическую обработку вели методом ANOVA ($p < 0.01$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Действие СОД-ХС-КАТ на тромбоциты

В условиях нормы перексид водорода служит молекулой внутри- и межклеточной передачи сигнала. В интервале концентраций 20–50 мкМ перексид водорода обладает ограниченной цитотоксичностью для многих типов клеток; в физиологических условиях концентрация пероксида водорода более 50 мкМ считается высокой [19]. В экспериментах *in vitro* добавление 50–2000 мкМ пероксида водорода приводило к агрегации тромбоцитов (рис. 1). Методами сканирующей электронной микроскопии показано, что на максимуме агрегационного ответа образовавшиеся агрегаты состоят в центральной части из плотно связанных тромбоцитов, а в периферической – из слабо связанных (рис. 1Б). К 5-й мин процесса размер агрегатов снижался, а их структура становилась настолько плотной, что не удавалось различить отдельные клетки (рис. 1В). Уменьшение размеров агрегатов происходило как за счет диссоциации слабо связанных тромбоцитов от агрегационных центров, так и благодаря уплотнению центральных областей агрегатов. Превентивно добавленная в кю-

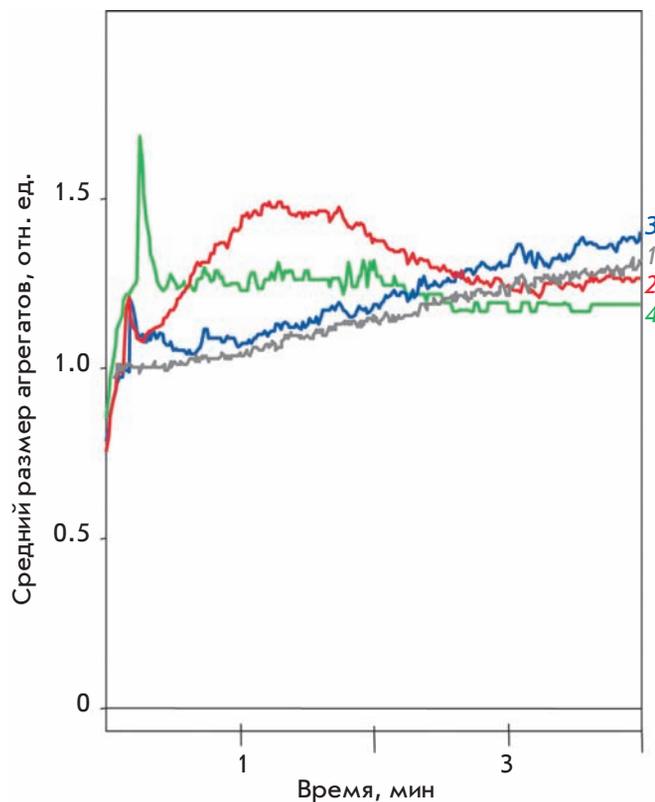


Рис. 2. Влияние пероксида водорода и производных КАТ и СОД-ХС-КАТ на агрегацию тромбоцитов. Кривая спонтанной агрегации тромбоцитов (1); агрегации в присутствии 300 мкМ H₂O₂ (2); при введении в кювету сначала 3000 Ед КАТ, а затем 300 мкМ H₂O₂ (3); при введении сначала 400 Ед КАТ-активности конъюгата СОД-ХС-КАТ, а затем 300 мкМ H₂O₂ (4).

вету агрегометра нативная КАТ в дозе 3000 Ед существенно снижает агрегационный эффект 300 мкМ пероксида водорода (рис. 2). Конъюгат СОД-ХС-КАТ нивелирует его уже в дозе 400 Ед КАТ-активности, демонстрируя повышенную дозозависимую антиоксидантную эффективность действия в сравнении с КАТ. Сами КАТ и ХС не оказывают влияния на агрегацию тромбоцитов.

Присутствие 300 мкМ H₂O₂ усиливает активацию тромбоцитов, регистрируемую по их агрегации, вызванную разными по механизму действия индукторами – АДФ, серотонином и TRAP (рис. 3). Превентивно введенные в ОТП 3000 Ед КАТ- или 400 Ед КАТ-активности конъюгата СОД-ХС-КАТ предупреждают активирующее действие H₂O₂ (кривые 4 и 5 на рис. 3А, 3Б, 3В соответственно). Применение конъюгата СОД-ХС-КАТ подтверждает его повышенную антиоксидантную активность, превосходящую действие КАТ. Эффект оказался дозозависимым,

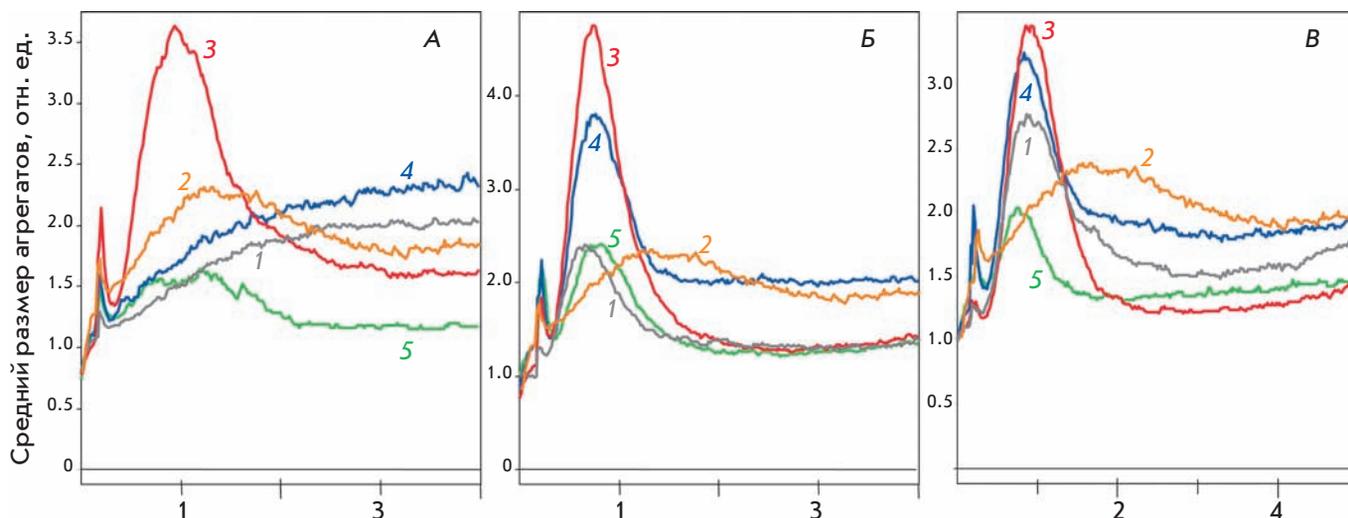


Рис. 3. Влияние КАТ и СОД-ХС-КАТ на агрегацию тромбоцитов, индуцированную АДФ (А), серотонином (Б) и TRAP (В) в присутствии H_2O_2 . А – Кривые агрегации тромбоцитов в присутствии 0.5 мкМ АДФ (1), 300 мкМ H_2O_2 (2), 0.5 мкМ АДФ и 300 мкМ H_2O_2 (3), превентивно введенных в кювету 3000 Ед КАТ и 0.5 мкМ АДФ с 300 мкМ H_2O_2 (4) и 400 Ед КАТ-активности СОД-ХС-КАТ и 0.5 мкМ АДФ с 300 мкМ H_2O_2 (5). Б – Кривые агрегации тромбоцитов в присутствии 0.5 мкМ серотонина (1), 300 мкМ H_2O_2 (2), 0.5 мкМ серотонина и 300 мкМ H_2O_2 (3), превентивно введенных в кювету 3000 Ед КАТ и 0.5 мкМ серотонина с 300 мкМ H_2O_2 (4) и 400 Ед КАТ-активности СОД-ХС-КАТ и 0.5 мкМ серотонина с 300 мкМ H_2O_2 (5). В – Кривые агрегации тромбоцитов в присутствии 1 мкМ TRAP (1), 300 мкМ H_2O_2 (2), 1 мкМ TRAP и 300 мкМ H_2O_2 (3), превентивно введенных в кювету 3000 Ед КАТ и 1 мкМ TRAP с 300 мкМ H_2O_2 (4), 400 Ед КАТ-активности СОД-ХС-КАТ и 1 мкМ TRAP с 300 мкМ H_2O_2 (5). Представлены типичные кривые из 4–5 экспериментов.

достигая наибольших значений (существенно не изменяющихся при дальнейшем увеличении дозы в кювете агрегометра) при 3000 и 400 Ед КАТ-активности для КАТ и СОД-ХС-КАТ соответственно.

Благодаря каталазной активности производные КАТ и СОД-ХС-КАТ нивелировали действие H_2O_2 на тромбоциты (рис. 2 и 3). Вместе с тем показано, что тромбоциты сами могут генерировать активные формы кислорода [20]. С этим согласуется ингибирующее действие производных СОД-ХС-КАТ на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов (рис. 4), когда эффект производного КАТ-ХС был весьма умеренным, а КАТ не обладала им вовсе (данные не приводятся). Биферментный конъюгат проявлял свое антиагрегатное действие как благодаря присутствию ферментативных активностей (кривые 1 и 2 на рис. 4), так и посредством своей уникальной надмолекулярной структуры, созданной с участием ХС (кривые 1 и 3 на рис. 4) [11, 17]. Действительно, сходная с СОД-ХС-КАТ по молекулярным размерам β -галактозидаза, использованная по той же схеме эксперимента в эквимолекулярных по белку концентрациях, не ингибировала индуцированную АДФ агрегацию тромбоцитов.

Действие СОД-ХС-КАТ проявлялось в ингибировании агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ,

серотонином или TRAP (индукторами с разным механизмом действия и при их разных концентрациях) (рис. 5). Это новое качество СОД-ХС-КАТ, не присущее в этих условиях его компонентам по отдельности.

Распластывание тромбоцитов на адгезивной поверхности является одной из критических стадий гомеостаза, индуцирующих каскад реакций, ведущих к формированию тромба. Адгезия и распластывание тромбоцитов происходит при их нанесении на стекло (рис. 6А). В присутствии H_2O_2 количество распластанных тромбоцитов возрастает (рис. 6Б), но при предварительном добавлении конъюгата СОД-ХС-КАТ на стекло (рис. 6В) или в ОТП (рис. 6Г) распластанные тромбоциты в образце полностью отсутствуют. Сходная картина наблюдается при нанесении ОТП с СОД-ХС-КАТ на стекло с предварительно нанесенным H_2O_2 (рис. 6Д). При добавлении ОТП с КАТ количество распластанных тромбоцитов значительно сокращалось (рис. 6Е). Заметим, что свободный ХС не проявлял антиагрегационного ингибирования против пероксида водорода. Вероятно, такой эффект биферментного конъюгата связан с его адгезивными и антиоксидантными свойствами, позволяющие ему, с одной стороны, защищать поверхность от адгезии тромбоцитов, а с другой – нейтрализовать H_2O_2 , ко-

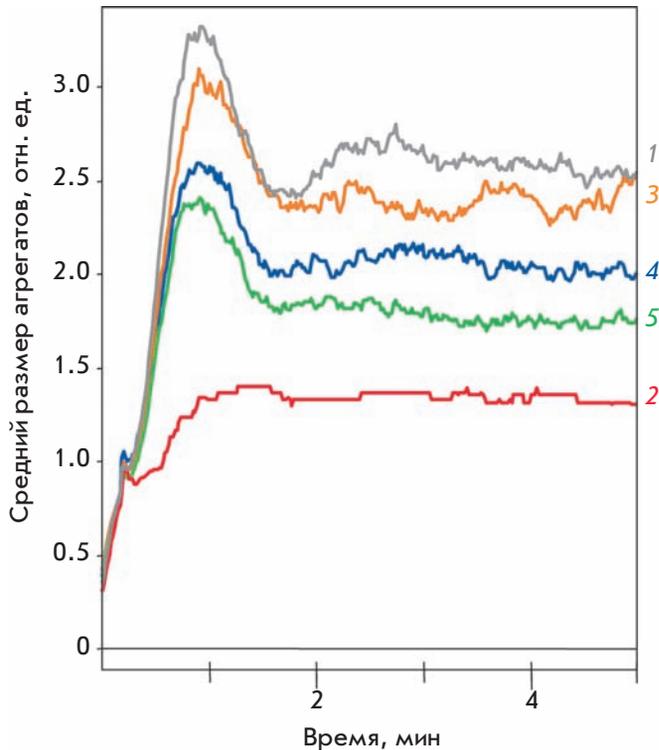


Рис. 4. Влияние производных СОД-ХС-КАТ на агрегацию тромбоцитов, индуцированную 0.5 мкМ АДП. Кривые агрегации в ответ на 0.5 мкМ АДП (1) и предварительно введенных в кювету в эквимольных концентрациях по белку, соответствующих 400 Ед КАТ-активности конъюгата СОД-ХС-КАТ: СОД-ХС-КАТ (2), СОД_{инакт.}-ХС-КАТ_{инакт.} (3), СОД-ХС-КАТ_{инакт.} (4), СОД_{инакт.}-ХС-КАТ (5). Представлены типичные кривые из 3–5 экспериментов.

торый усиливает адгезию и распластывание тромбоцитов на стекле.

Полученные результаты указывают на выраженное антиоксидантное дозозависимое действие биферментного конъюгата СОД-ХС-КАТ при индуцированной агрегации тромбоцитов в присутствии пероксида водорода. Антиагрегационная активность конъюгата СОД-ХС-КАТ достоверно выше таковой для других производных КАТ и проявляется в широком интервале условий при стимулировании тромбоцитарной агрегации разными по механизму действия индукторами (АДП, серотонин, ТРАР) как с пероксидом водорода, так и без него. Последнее демонстрирует новое качество антитромбоцитарного потенциала СОД-ХС-КАТ, отсутствующее у нативных, входящих в его состав ферментов и свободного ХС, и обусловленное его молекулярным составом и размерами. Такая совокупность свойств биферментного конъюгата СОД-ХС-КАТ определяет перспективность его биофармацевтической разработки для целей антиоксидантной

терапии и продуктивность получения ферментных конъюгатов лечебного назначения.

Изменения тонуса кольцевого артериального фрагмента сосуда крысы

Окислительный стресс тонуса кольцевого фрагмента брюшной аорты крысы моделировали введением в инкубационный раствор пероксида водорода на фоне норадреналиновой преко́нстрикции. Последняя составляла 50–60% от максимально возможного сокращения артериального фрагмента, что позволяло фиксировать и сокращение, и расслабление. Изменение тонуса сосуда оценивалось относительно величины сокращения в ответ на 0.1 мкМ НА, взятого по величине интервала за 100% (для градации величины изменений тонуса), а по исходному уровню эксперимента — за ноль (для указания направления изменений тонуса — сокращение или расслабление). Пероксид водорода вызывал дозозависимое сокращение фрагмента сосуда. При концентрации H_2O_2 0.01 мМ наблюдалось небольшое (10–12%) увеличение тонуса, при 0.1 мМ H_2O_2 оно возрастало (48–50%) с последующим возвращением к исходному уровню НА преко́нстрикции (расслабление 0–3%). При концентрации 1.0 мМ H_2O_2 отмечалось быстрое сокращение артериального фрагмента (88–90%), которое сменялось фазой расслабления (68–70%). Таким образом, предложенная модель обнаружила дозозависимое действие пероксида водорода и оказалась пригодной для экспериментального изучения влияния АФК на тонус сосудистого фрагмента.

После трехкратной отмывки и 15-мин периода покоя фрагмент сосуда подвергался повторному воздействию НА и пероксида водорода в использованных ранее концентрациях (0.01–1.0 мМ). Уровень функциональной активности сосудистого фрагмента при повторном ответе снижался с ростом используемых концентраций пероксида водорода как в отношении второго введения НА, так и величины сокращения при повторном введении H_2O_2 (рис. 7). Достоверное уменьшение повторного сокращения артериального фрагмента на вторичное введение больших концентраций пероксида водорода служит мерой сохранности сосудистых реакций.

Введение нативной КАТ на фоне индуцированной НА преко́нстрикции не оказывало влияния на тонус сосуда в любой из использованных концентраций. Реакция на введение 1.0 мМ H_2O_2 в присутствии КАТ существенно уменьшалась в отношении сокращения и расслабления. В концентрации 1000 Ед/мл КАТ эффект 1.0 мМ H_2O_2 снижался до 16% сокращения. КАТ проявляла дозозависимое защитное действие против стимуляции сосудистого фрагмента пероксидом водорода.

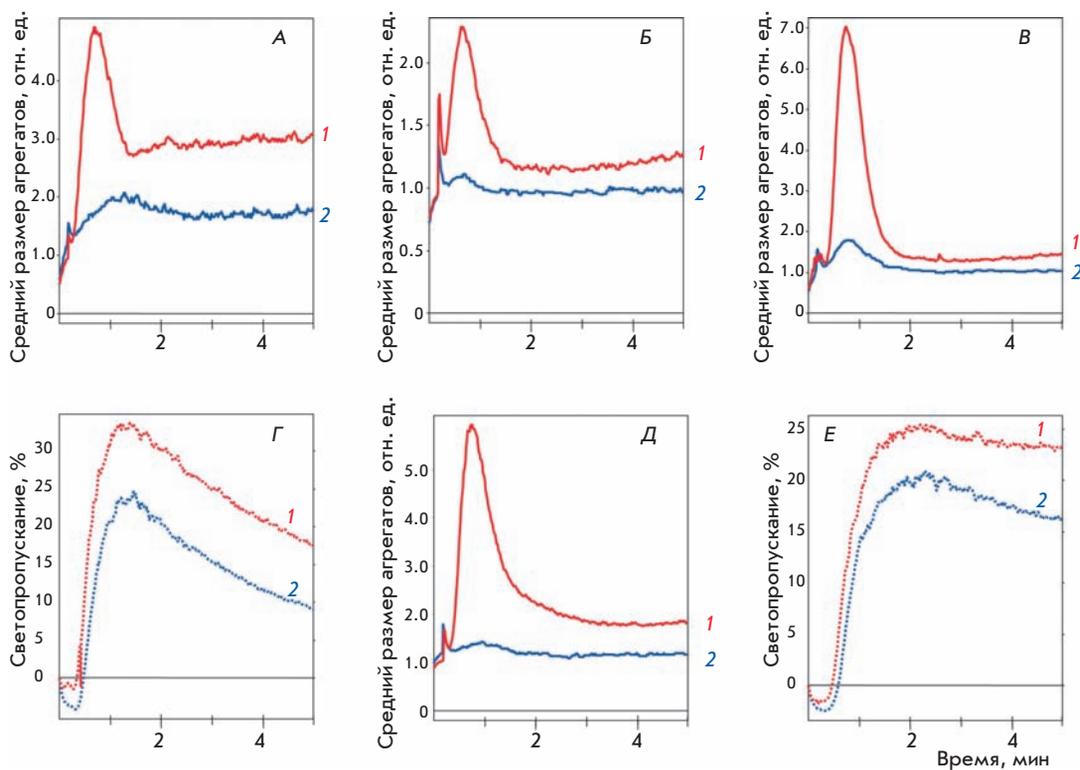


Рис. 5. Влияние биферментного конъюгата СОД-ХС-КАТ (400 Ед КАТ-активности в кювете, кривая 2) на агрегацию тромбоцитов, индуцированную (кривая 1): 0.5 мкМ (А) и 5.0 мкМ (Г) АДФ; 0.5 мкМ (Б) и 5.0 мкМ (Д) серотонина; 1 мкМ (В) и 6 мкМ (Е) TRAP. Представлены типичные кривые из 3–6 экспериментов. По оси ординат – средний размер агрегатов (в отн. ед., А–В, Д) или степень светопропускания (в %, Г и Е).

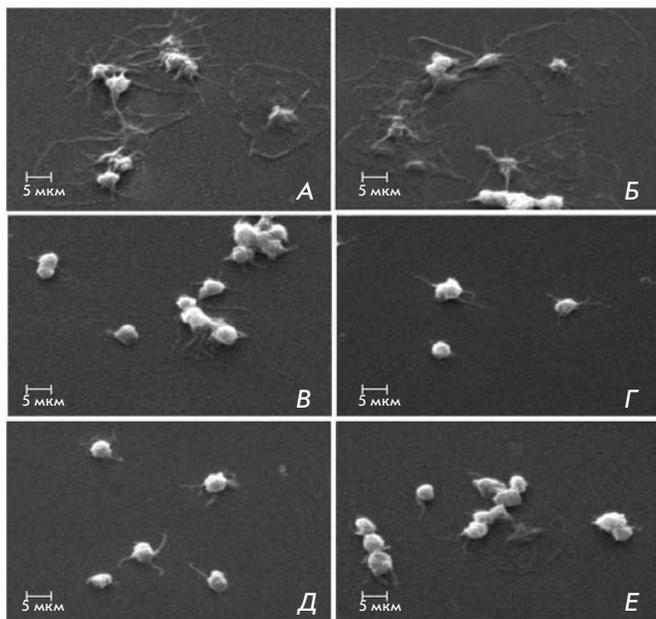


Рис. 6. Адгезия тромбоцитов на стекле. Электронные микрофотографии, полученные с помощью СЭМ PHILLIPS PSEM 550x (увеличение 2500x). Адгезия тромбоцитов на стекле с добавлением к ОТП: физиологического раствора (А), H_2O_2 (Б), СОД-ХС-КАТ (Г). Адгезия тромбоцитов на стекле, предварительно обработанном СОД-ХС-КАТ с последующим нанесением ОТП с H_2O_2 (В). Адгезия тромбоцитов на стекле, предварительно обработанном H_2O_2 с последующим нанесением ОТП с СОД-ХС-КАТ (Д) или ОТП с КАТ (Е).

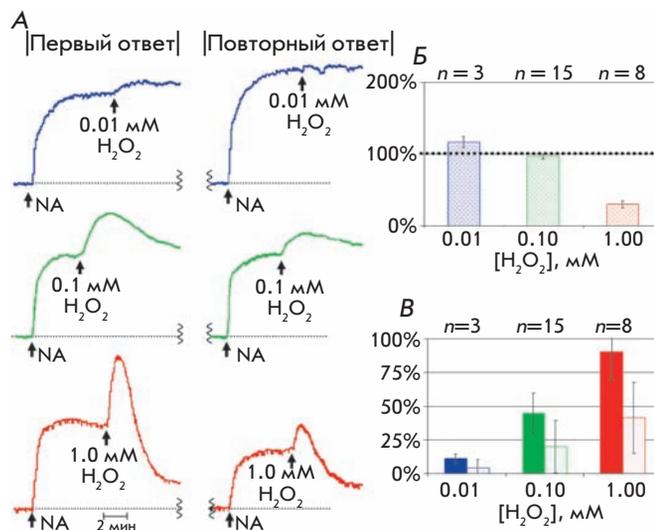


Рис. 7. Первый и повторный ответы фрагмента аорты на NA и H_2O_2 . А – Записи изменений тонуса артериального фрагмента (по оси ординат) первого и повторного ответа на NA и H_2O_2 . Б – Величина повторного ответа на норадреналин, за 100% принята величина первого ответа на NA. В – величина первого (закрашенные столбцы) и повторного (незакрашенные столбцы) сокращения, вызванного H_2O_2 в разных концентрациях.

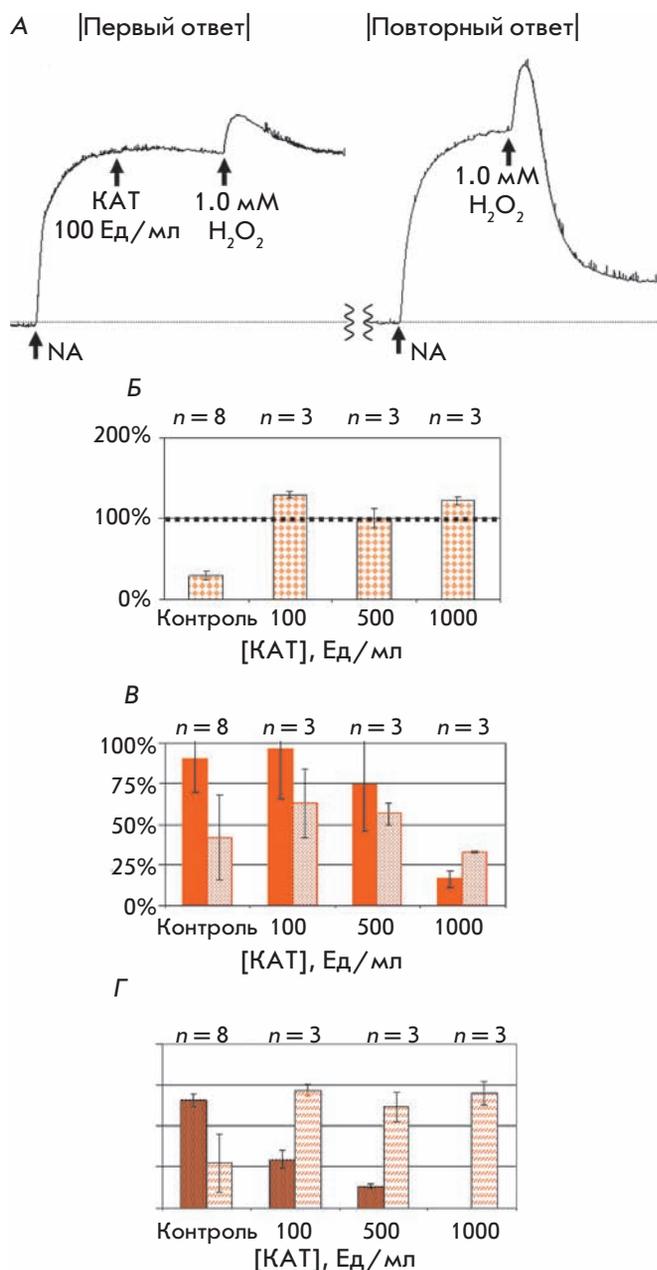


Рис. 8. Дозозависимое влияние нативной каталазы на тонус артериального фрагмента при повторном введении норадреналина и 1.0 мМ пероксида водорода. А – Записи изменений тонуса артериального фрагмента (по оси ординат). Б – Величина повторного ответа на норадреналин. За 100% принята величина первого сокращения на NA. Величина первого (закрашенные столбцы) и второго (незакрашенные столбцы) сокращения (В) и расслабления (Г) артериального фрагмента в ответ на введение 1.0 мМ H₂O₂.

Предварительная инкубация артериального фрагмента с КАТ существенно влияла на сохранность повторных ответов на NA и пероксид водорода (рис. 8). При концентрации КАТ 100 Ед/мл и выше сохранялась величина повторного ответа на NA, тогда как в отсутствие фермента она снижалась в 3–4 раза (рис. 8Б). Присутствие КАТ при первом добавлении H₂O₂ увеличивало повторный сократительный и дилатационный ответ (по сравнению с контролем), а при использовании 1000 Ед/мл КАТ – повторный ответ достоверно превосходил первый (рис. 8В и 8Г). Поскольку без КАТ сосудистые реакции на повторное действие NA и H₂O₂ заметно снижаются, защитное действие КАТ очевидно. Данные, полученные при использовании 0.1 мМ H₂O₂ для 25–500 Ед/мл КАТ, подтверждают это заключение.

Превентивный характер действия антиоксидантных средств подразумевает проявление их защитного эффекта уже при начальном превышении физиологического уровня АФК. Поэтому мы использовали 0.1 мМ H₂O₂ для оценки сравнительной эффективности защитного действия КАТ и конъюгата СОД-ХС-КАТ в нашей экспериментальной модели в тесте на сохранность функционирования сосуда (рис. 9). Производные КАТ использовались в одинаковых концентрациях по каталазной активности (Ед/мл). Нативная КАТ и конъюгат СОД-ХС-КАТ сохраняли уровень ответа на повторное введение NA (рис. 9Б), сравнимое с контрольными показателями. В концентрационном диапазоне 25–100 Ед/мл каталазной активности производные КАТ и СОД-ХС-КАТ проявляли сходный по величине защитный эффект против действия 0.1 мМ H₂O₂. При концентрации 500 Ед/мл конъюгат СОД-ХС-КАТ снижал амплитуду ответа на H₂O₂ более эффективно, чем КАТ. Выраженное защитное действие СОД-ХС-КАТ может быть связано с его сродством к сосудистой стенке (благодаря конъюгированию СОД с КАТ через гликозаминогликан эндотелиального гликокаликса ХС [11, 17]) и/или с присутствием в модельной системе СОД и эндогенного NO. Оценивать сорбцию ферментных производных в используемой системе затруднительно из-за протекания в ней сосудистых реакций не только изнутри наружу, но и снаружи внутрь сосуда (т.е. при возможности инициирующего действия стимула как на интиму, так и адвентицию сосудистой стенки) [21], а оценить защитное действие СОД в отношении NO вполне возможно.

Это действие оказалось достаточно выраженным для нативной СОД и СОД-ХС-КАТ на NA-преконстрикцию артериального фрагмента (рис. 10). Оба производных вызывали достоверное расслабление сосуда. Это предполагает, что наблюдаемая дилатация обусловлена сохранением эндогенного NO,

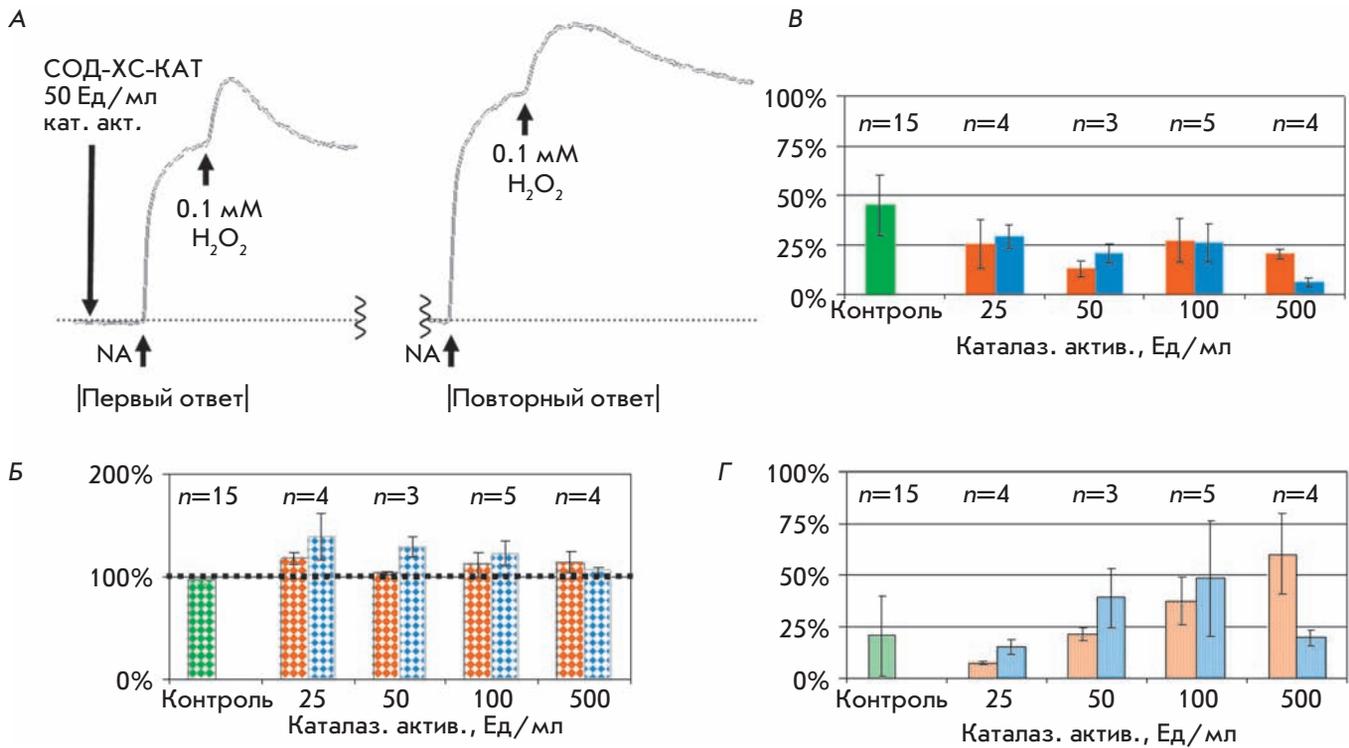


Рис. 9. Сравнение защитного действия КАТ и СОД-ХС-КАТ в условиях окислительного стресса, вызванного 0.1 мМ H₂O₂. А – Запись сокращения фрагмента аорты (по оси ординат). Б – Величина повторного ответа на NA после добавления разных концентраций КАТ (коричневые столбцы) и СОД-ХС-КАТ (синие столбцы), одинаковых (в сопоставляемой паре сравнения) по каталазной активности. В и Г – Сокращения фрагмента аорты при соответственно первом (В) и повторном (Г) ответах на 0.1 мМ H₂O₂ в присутствии (в первом ответе) указанных концентраций КАТ (слева в паре сравнения) и СОД-ХС-КАТ (справа в паре сравнения) по каталазной активности (Ед/мл).

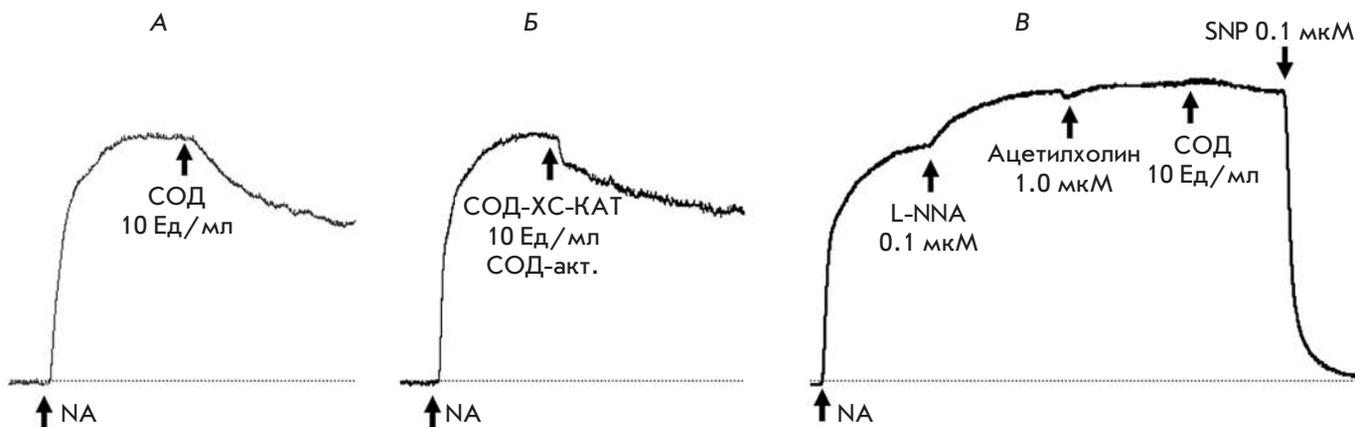


Рис. 10. Влияние СОД-активности на тонус артериального фрагмента. Записи изменений тонуса фрагмента аорты (по оси ординат) при введении 10 Ед/мл нативной СОД (А) или такой же концентрации по активности СОД конъюгата СОД-ХС-КАТ (Б) на фоне норадреналиновой преко́нстрикции. В – Изменение сосудистого тонуса при введении норадреналина, N-нитро-L-аргинина (L-NNA), ацетилхолина, нативной СОД и нитропрусида натрия (SNP). Сходные кривые получены при выполнении 3–4 экспериментов.

потому что СОД нейтрализует супероксид-радикал, который способен превращать NO в пероксинитрит, не обладающий вазодилатирующими свойствами. Экспериментальным подтверждением этому является эффект ингибитора NO-синтазы, N_ω-нитро-L-аргинина (L-NNA), который вызвал повышение сосудистого тонуса (рис. 10B). Этот эффект показал выраженное ингибирование активности NO-синтазы и развитие сократительного ответа из-за дефицита дилатационного влияния эндогенного NO. Введение ацетилхолина (как индуктора сосудистого расслабления посредством воздействия на эндотелиальные рецепторы, запускающие работу NO-синтазы) не давало отклика, что указывает на эффективное ингибирование NO-синтазы. На фоне L-NNA введение 10 Ед/мл СОД-активности не вызывало эффекта, что подтверждает роль эндогенного NO в наблюдаемом ранее расслаблении артериального фрагмента. Введение донора NO – нитропрусида натрия (SNP) – вызывало дилатацию (рис. 10B), т.е. сосудистый фрагмент не потерял способность расслабляться под действием NO. Увеличение биодоступности NO при использовании конъюгата СОД-ХС-КАТ (рис. 10Б), сходное по величине с эффектом нативной СОД (рис. 10А), демонстрирует эффективность вазопротекторного действия биферментного конъюгата благодаря активности его СОД-компонента.

Биферментный конъюгат СОД-ХС-КАТ в целом достоверно проявляет свои вазопротекторные свойства благодаря активности его обоих ферментных компонентов (СОД и КАТ), не уступая по эффективности действия нативным формам биокатализаторов. Это убедительно указывает на целесообразность биофармацевтической разработки конъюгата СОД-ХС-КАТ как лекарственного кандидата. Такой статус, конечно, требует оценки эффективности и безопасности разрабатываемого производного в системах *in vivo*.

Вазоактивность конъюгата СОД-ХС-КАТ *in vivo*

Внутривенное болюсное введение кроликам разных доз (в десятикратном диапазоне) конъюгата СОД-ХС-КАТ продемонстрировало, что показатели АД и ЧСС отклонялись не более чем на 4% от средних значений у интактных наркотизированных животных. На ЭКГ кроликов не обнаружено изменений ST-интервала, нарушений ритма, проводимости и других показателей даже при 10-кратных эффективных дозах введения конъюгата. Тестирование однократного внутрибрюшного введения СОД-ХС-КАТ мышам линии BALB/c и мышам-гибридам F1 (СВАхС57В16) обнаружило низкую острую токсичность конъюгата и отсутствие у него в тесте Эймса мутагенных свойств. Эти данные, вместе с отмечен-

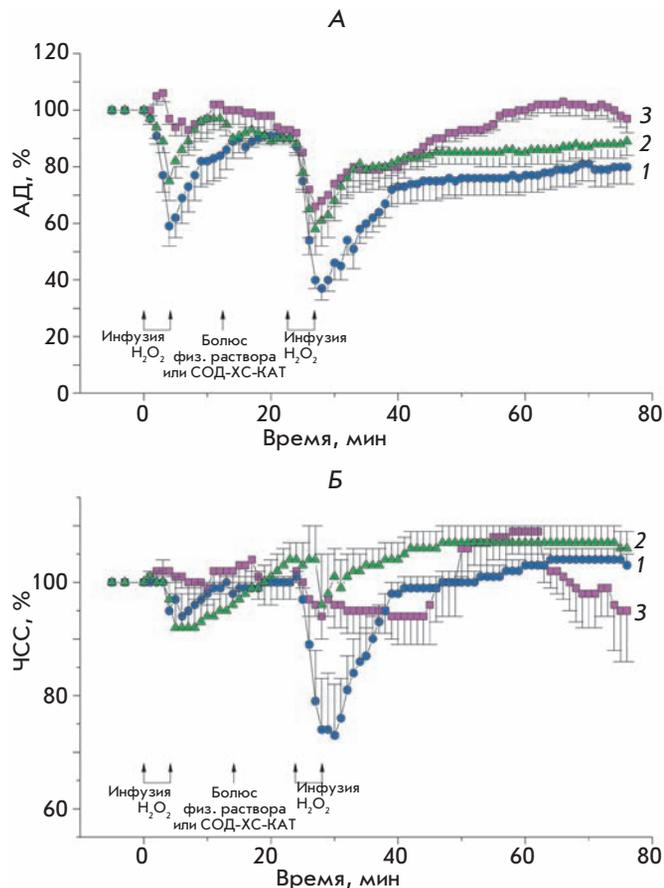


Рис. 11. Изменение АД (А) и ЧСС (Б, оба в % от исходного) у анестезированных кроликов при окислительном стрессе (инфузия 0.8% пероксида водорода) в контрольной (болюсное введение физиологического раствора, кривая 1, n = 12) и опытной (болюсное введение конъюгата СОД-ХС-КАТ, кривая 2, n = 9) группах. Кривая 3 относится к опытной профилактической группе кроликов, получавших конъюгат СОД-ХС-КАТ за 3 сут до проведения этого эксперимента с пероксидом водорода и после его первого введения (n = 6). Стрелками показаны моменты начала и окончания инфузии пероксида водорода и болюсного введения физиологического раствора или конъюгата СОД-ХС-КАТ (1.5 мг/кг).

ной выше хорошей переносимостью организмом животных конъюгата СОД-ХС-КАТ и его выраженной антитромботической активностью [11, 17], подтверждают целесообразность его дальнейшего биомедицинского изучения.

Первое введение пероксида водорода интактным кроликам (кривая 1 на рис. 11А) вызывало резкое снижение АД (до 60% от первоначального уровня), которое в течение 10 мин восстанавливалось в контрольной группе до 90% от исходного уровня. Сход-

ные изменения АД наблюдались в опытной группе (кривая 2 на рис. 11А). Интересно отметить, что профилактическое введение производного СОД-ХС-КАТ за трое суток до эксперимента с пероксидом водорода (рис. 11) достоверно предупреждало падение АД, вызывая сначала лишь его небольшие колебания, сглаживая их и удерживая в дальнейшем показатели АД около исходного уровня (кривая 3 на рис. 11А). Превентивное введение СОД-ХС-КАТ обеспечивало его профилактический эффект и в отношении ЧСС кроликов (кривая 3 на рис. 11Б) в сравнении с данными контрольной (кривая 1 на рис. 11Б) и опытной (кривая 2 на рис. 11Б) групп.

После 10-мин распределения биферментного конъюгата в организме кроликов, который не изменял показателей центральной гемодинамики, повторно (на 20-й мин) вводился пероксид водорода в той же дозе и с той же скоростью. Его вторая инфузия вызывала более глубокие изменения АД и ЧСС (рис. 11). В ходе восстановления АД наблюдались две стадии: быстрая, в течение первых 5 мин, и медленная.

В опытной группе после введения производного СОД-ХС-КАТ реакция АД и ЧСС на вторую повреждающую дозу пероксида водорода была достоверно меньше, а восстановление быстрее, чем в контрольной группе (рис. 11).

ЭКГ у кроликов после первого введения пероксида водорода существенно не изменялась, хотя в контрольной группе наблюдалось некоторое снижение ST-сегмента. При повторном введении пероксида водорода отмечались наибольшие подъемы ST-интервала, особенно при затрудненном дыхании у кроликов. На 5–8 мин наблюдалась желудочковая экстрасистолия с одиночными или групповыми экстрасистолами. Если одышка отмечалась у кроликов уже после первого введения пероксида водорода, то при повторном введении наблюдалось затрудненное дыхание, бронхоспазмы, более выраженные в контрольной группе.

Первое введение пероксида водорода крысам вызывало первоначальное кратковременное (не более 1 мин) повышение АД на 3–5% с его последующим снижением на 15% и полным восстановлением в течение 10 мин (рис. 12А). В этих условиях ЧСС снижалась на 3–5% и в течение 10 мин восстанавливалась до уровня 96–98% (кривые 1 и 2 на рис. 12Б). Введение производного СОД-ХС-КАТ не изменяло параметры гемодинамики и ЭКГ у крыс. После распределения в организме в течение 10 мин биферментного конъюгата крысам повторно вводили пероксид водорода. Наблюдались более резкие (по сравнению с первой инфузией) изменения АД и ЧСС. Снижение АД доходило до 52% уровня в контрольной группе и до 73% уровня в опытной груп-

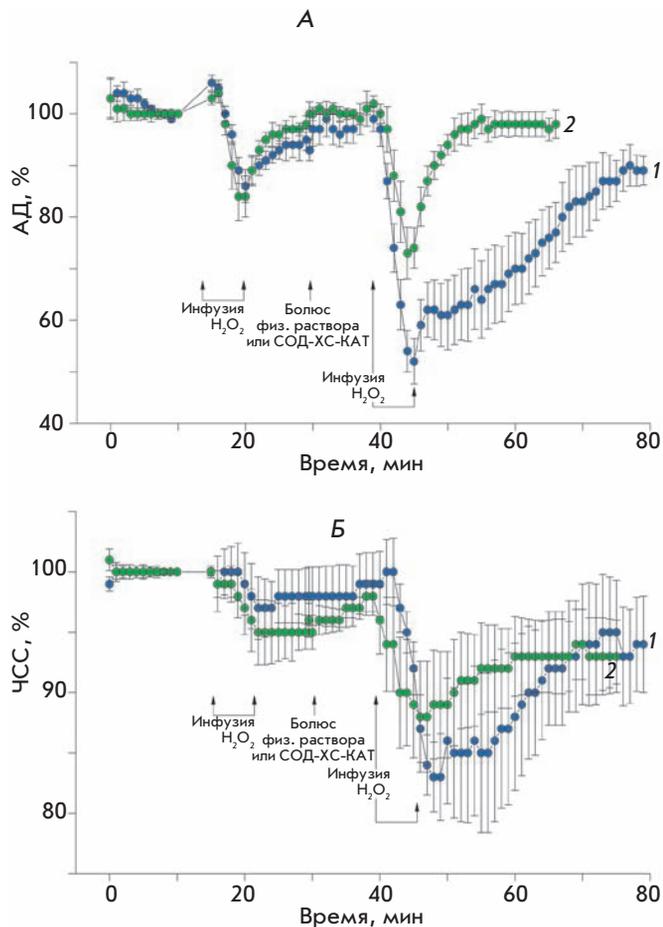


Рис. 12. Изменение АД (А) и ЧСС (Б, оба в % от исходного значения) у анестезированных крыс. Стрелками показаны моменты начала и окончания внутривенной инфузии 0.8% пероксида водорода (окислительный стресс) и болюсного введения физиологического раствора ($n = 6$, контрольная группа, кривая 1) или конъюгата СОД-ХС-КАТ ($n = 7$, опытная группа, кривая 2).

пе (кривые 1 и 2 соответственно, $p < 0.05$, рис. 12А). В контроле восстановление АД было значительно медленнее. Статистически значимое различие в восстановлении АД в опытной и контрольной группах наблюдались уже с первых минут.

Форма сигнала ЭКГ крыс в период эксперимента существенно не менялась, хотя количество отдельных желудочковых экстрасистол возрастало в обеих группах животных, особенно при повторном введении пероксида водорода.

Итак, биферментный конъюгат СОД-ХС-КАТ обладал достоверной способностью предупреждать изменения гемодинамики, вызываемые пероксидом водорода, у двух видов животных. Конъюгат СОД-ХС-КАТ успешно противодействовал прямому влия-

нию пероксида водорода на гладкомышечные и сердечные клетки [22], вероятно, за счет нейтрализации как супероксид-радикала, так и пероксида водорода. Действие СОД-ХС-КАТ достоверно проявлялось перед повторным введением пероксида водорода, когда антиоксидантная защита организма была уже ослаблена первым введением H_2O_2 .

Профилактический эффект конъюгата СОД-ХС-КАТ был выражен гораздо сильнее у тех кроликов, которым вводили высокие дозы конъюгата за 3 дня до острого опыта. При этом полностью предотвращалось снижение АД и ЧСС в ответ на первое введение пероксида водорода. Это наилучший антиоксидантный эффект по сравнению с другими исследованными в нашей работе случаями. Вероятно, превентивно введенный конъюгат мог напрямую и/или опосредованно обеспечивать успешное противодействие острому эффекту пероксида водорода. Значение каталазной активности подтверждается также необходимостью ее присутствия при опытной терапии лецитинизированной СОД мышей с индуцированным блеомицином легочным фиброзом [23]. На колоколообразной кривой дозозависимости эффекта лечебное действие лецитинизированной СОД (в области ее высоких доз) восстанавливалось дополнительным введением КАТ, устраняющим накопление пероксида водорода. Присутствие в биферментном конъюгате сопряженных друг с другом супероксиддисмутазной и каталазной активностей оптимизировало его антитромботическое действие [9, 17] и обеспечивало безопасную нормализацию АД и ЧСС при возмущающем эффекте пероксида водорода (рис. 11 и 12). Отмеченная в других исследованиях эффективность перорального [24] и ингаляционного [23] применения модифицированной формы СОД указывает на актуальность разработки пероральных форм СОД-ХС-КАТ для профилактических потребностей антиоксидантной терапии [25].

ВЫВОДЫ

Данные настоящего исследования показывают реальную возможность получения надмолекулярных ферментных конъюгатов, потенциально эффективных и безопасных для целей практической медицины. Ковалентное сшивание ферментных субъединиц обеспечивает взаимную стабилизацию активности биокатализаторов. Рост молекулярной массы получаемого при этом конъюгата (по сравнению с исходными белковыми компонентами) и включение в его

состав хондроитинсульфата – гликозаминогликана эндотелиального гликокаликса – способствует вазопротекторной активности производного СОД-ХС-КАТ у люминальной поверхности сосудистой стенки. Лечебный эффект экспериментальной терапии конъюгатом СОД-ХС-КАТ определяется ковалентным сопряжением супероксиддисмутазной и каталазной активностей биокатализаторов, способствующим их комбинированному каталитическому действию с образованием безопасных конечных продуктов ферментативного превращения. Возникающая надмолекулярная структура биферментного наноконъюгата обуславливает появление у него нового качества – антиагрегационной активности при индуцированной агрегации тромбоцитов. Активность компонентов СОД-ХС-КАТ проявляется на высоком уровне: влияние супероксиддисмутазной и каталазной активностей конъюгата на тонус сосудистого фрагмента сходно с таковым у нативных ферментов; заметен вклад в антиагрегационный эффект конъюгата хондроитинсульфата. Отмеченные свойства определяют наибольшее антиоксидантное действие конъюгата СОД-ХС-КАТ среди различных сочетаний его компонентов. Хорошая переносимость организмом производного СОД-ХС-КАТ, его удовлетворительная острая токсичность, нормализующее действие на показатели гемодинамики при окислительном стрессе, выраженный профилактический эффект делают биферментный конъюгат перспективным лекарственным кандидатом. Представленные исследования иллюстрируют новый путь разработки ферментных конъюгатов медицинского назначения. ●

Работа выполнена при поддержке Федеральной целевой научно-технической программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники» по направлениям «Биокаталитические технологии для химического синтеза, аналитических систем и медицины» и «Разработка средств и методов диагностики и лечения больных ишемической болезнью сердца», грантами РФФИ 06-08-00011, 06-04-08002-офи, 09-08-00023, Росздравом, Росмедтехнологий, а также Минздравсоцразвития России. Авторы выражают искреннюю благодарность за внимание и поддержку настоящего исследования академику Е.И. Чазову, чл.-корр. РАН В.Н. Смирнову, чл.-корр. РАМН В.В. Кухарчуку и профессору С.А. Бойцову.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Marder V.J., Sherry S. // *New Engl. J. Med.* 1988. V. 318. P. 1512–1520.
2. Anderson A.V., Willerson J.T. // *New Engl. J. Med.* 1993. V. 329. P. 703–709.
3. Максименко А.В. // *Мол. биол.* 1995. Т. 29. № 1. С. 38–60.
4. Collen D., Lijnen H.R. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2009. V. 29. P. 1151–1155.
5. Ishihara T., Tanaka K., Tasaka Y., Namba T., Suzuki J., Ishihara T., Okamoto S., Hibi T., Takenaga M., Igarashi R., Sato K., Mizushima Y., Mizushima T. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2009. V. 328. P. 152–164.
6. Taylor J.K., Gardner T.B., Waljee A.K., Dinagno M.J., Schoenfeld P.S. // *Aliment. Pharmacol.* 2010. V. 31. P. 57–72.
7. Меньшикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З., Бондарь И.А., Труфакин В.А. Окислительный стресс. Патологические состояния и заболевания. Новосибирск: АРТА, 2008. 284 с.
8. Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток. М.: Медицинская пресса, 2006. 400 с.
9. Максименко А.В. // *Хим.-фарм. журн.* 2007. Т. 41. № 5. С. 3–12.
10. Меньшикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. М.: Слово, 2006. 556 с.
11. Maksimenko A.V. // *Curr. Pharm. Design.* 2005. V. 11. P. 2007–2016.
12. Wight T.N., Merrilees M.J. // *Circ. Res.* 2004. V. 94. P. 1158–1167.
13. Максименко А.В., Тищенко Е.Г. // *Биохимия.* 1997. Т. 62. С. 1353–1363.
14. Murthy M.R.N., Reid T.J.III, Sicignano A., Tanaka N., Rossmann M.G. // *J. Mol. Biol.* 1981. V. 152. P. 465–499.
15. Tainer J.A., Getroff E.D., Beem K.M., Richardson J.S., Richardson D.C. // *J. Mol. Biol.* 1982. V. 160. P. 181–217.
16. Максименко А.В., Тищенко Е.Г. // *Биохимия.* 1997. Т. 62. № 10. С. 1364–1368.
17. Maksimenko A.V., Golubykh V.L., Tischenko E.G. // *J. Pharmacy Pharmacol.* 2004. V. 56. P. 1463–1468.
18. Ваваев А.В., Тищенко Е.Г., Мох В.П., Максименко А.В. // *Технол. жив. систем.* 2009. Т. 6. № 3. С. 26–32.
19. Halliwell B., Clement M.V., Long L.H. // *FEBS Lett.* 2000. V. 486. P. 10–13.
20. Krotz F., Sohn H.-Y., Pohl U. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004. V. 24. P. 1988–1996.
21. Maiellaro K., Taylor W.R. // *Cardiovasc. Res.* 2007. V. 75. P. 640–648.
22. Капелько В.И. // *Рос. физиол. журн.* 2004. Т. 62. № 10. С. 1364–1368.
23. Tanaka K.I., Ishichera T., Azuma A., Kudoh S., Ebina M., Nukiwa T., Sugiyama Y., Tasaka Y., Namba T., Ishihara T., Sato K., Mizushima Y., Mizushima T. // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2010. V. 298. P. L348–L360.
24. Suzuki Y., Matsumoto T., Okamoto S., Hibi T. // *Colorectal. Dis.* 2008. V. 10. P. 931–934.
25. Максименко А.В., Ваваев А.В. // *Мол. мед.* 2010. № 2. С. 9–14.

УДК 577.122:616.65-006-07

База данных «Протеомика рака простаты»

С. С. Шишкин¹, Л. И. Ковалев¹, М. А. Ковалева¹, И. Н. Крахмалева¹, К. В. Лисицкая¹,
Л. С. Еремина¹, А. В. Иванов¹, Е. В. Герасимов¹, Э. Г. Садыхов¹, Н. Ю. Уласова²,
О. С. Соколова², И. Ю. Торопыгин³, В. О. Попов¹

¹Учреждение Российской академии наук Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071, Москва, Ленинский проспект, 33

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, МГУ, 1

³Учреждение Российской академии медицинских наук НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, 119121, Москва, ул. Погодинская, 10

E-mail: shishkin@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 28.09.2010 г.

РЕФЕРАТ На основе результатов протеомных исследований тканей простаты от пациентов со злокачественными и доброкачественными опухолями, а также ряда культивируемых клеточных линий человека создан информационный ресурс – база данных «Протеомика рака простаты» («ПП», <http://ef.inbi.ras.ru>). «ПП» содержит семь взаимосвязанных модулей, в состав каждого из которых входят протеомные и биомедицинские данные о белках объекта исследований, представленные на четырех информационных уровнях. Основа модулей – синтетические двумерные карты (первый информационный уровень), представляющие собой обобщенные результаты фракционирования белков методом двумерного электрофореза. На каждой карте показаны белки, идентифицированные с помощью масс-спектрометрии. Второй информационный уровень образуют данные, полученные при изучении свойств каждого из идентифицированных белков. На третьем уровне собраны различные опубликованные материалы о каждом белке, включая биомедицинские сведения. На четвертом уровне представлены интернет-ссылки, связывающие описание белка в «ПП» с записями в публичных базах данных NCBI и UniProt. Всего в «ПП» представлена информация о 359 белках, среди которых оказались 17 потенциальных белковых маркеров рака простаты, в частности AGR2, представители семейств аннексинов, S100 и ряд других белков, включая новые белки PRO2675 и PRO2044. Созданная база данных может быть использована для решения широкого круга задач, в число которых входит изучение молекулярных основ этиологии и патогенеза заболеваний простаты, поиск новых диагностических маркеров и т.д.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: протеомика, рак простаты, компьютерная база данных.

ВВЕДЕНИЕ

Первое десятилетие постгеномной эры ознаменовалось интенсивным развитием биоинформатики, расширением хорошо известных крупных баз данных (в частности, NCBI и UniProt), а также созданием во многих странах специальных информационных ресурсов, предназначенных для обеспечения разнообразных биомедицинских исследований [1–4]. В этом отношении на фоне информационных ресурсов, созданных в Ирландии (UCD-2DPAGE, <http://proteomics-portal.ucd.ie:8082/cgi-bin/2d/2d.cgi>) [2] и Индии (Human Proteinpedia, www.humanproteinpedia.org) [3], достижения отечественных ученых выглядят весьма скромными.

В настоящее время одним из наиболее актуальных направлений в биомедицинских исследованиях пред-

ставляется поиск эффективных биомаркеров рака простаты (РП), которые могли бы обеспечить разработку новых методов диагностики этого заболевания [5–8]. Значительное внимание к РП обусловлено тем, что за последние годы частота этого заболевания значительно возросла, в том числе и в России [9, 10], а в ряде стран РП вышел на первое место по частоте встречаемости в структуре мужской онкопатологии [11, 12]. В ранней диагностике РП в настоящее время центральное место принадлежит определению в крови одного из наиболее изученных биомаркеров – так называемого простат-специфического антигена (ПСА). Однако известно, что этот тест дает значительное количество ложноположительных и ложноотрицательных результатов, которые приводят не только к негативным клиническим послед-

ствиям, но и к большим финансовым потерям [5, 7]. Как следствие, в США и других западных странах развернулись поиски новых биомаркеров РП, которые особенно активизировались благодаря развитию протеомных и других постгеномных технологий [6, 8, 13].

На основе использования различных протеомных технологий с 2005 г. в Институте биохимии им. А.Н. Баха РАН в сотрудничестве с рядом других научных и медицинских учреждений также проводятся поиски новых биомаркеров РП [14, 15]. Для оптимизации этих исследований в 2009 г. был создан отечественный информационный ресурс «Протеомика рака простаты» («ПРП», <http://ef.inbi.ras.ru>), в котором суммированы экспериментальные материалы, собраны актуальные опубликованные данные с указанием источников, а также приведены ссылки на ряд других биомедицинских информационных ресурсов, представленных в сети Интернет. В данной статье описана структура новой расширенной версии «ПРП» и рассмотрены возможности использования этого информационного массива.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Биоматериалы – биоптаты и операционный материал тканей простаты больных РП ($n = 72$) и доброкачественной гиперплазией простаты (ДГП, $n = 69$) – предоставлены сотрудниками отделения урологии городской клинической больницы им. С.П. Боткина. Диагностика заболеваний осуществлялась с использованием клинических, гистологических и иммунохимических (определение уровня ПСА) методов. Проводимую с целью гистологической верификации диагноза трансректальную мультифокальную пункционную биопсию выполняли под контролем трансректальной ультрасонографии и получали от одного больного до 18 образцов тканей из различных зон простаты [16, 17]. Гистологически все случаи РП были охарактеризованы как аденокарцинома. Стадию рака по Глиссону определяли по общепринятой методике [16, 17].

Параллельно анализировали белки клеточных культур РС-3 (ACC 465), DU-145 (ACC 261), ВРН-1 (ACC 143), приобретенных в German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Германия), а также культивируемых клеток линии LNCaP, образцы которой получены от И.Г. Шемякина (ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, г. Оболensk). Клетки культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением NEPEs, пирувата натрия, гентамицина и 20% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) как описано ранее [18]. Клетки выращивали с использованием культурального пластика («Costar», США и «Nunc», Дания) в CO₂-инкубаторе («Sanyo», Япония). Кроме того, ис-

следовали белки культивируемых клеток двух линий рабдомиосаркомы человека (A-204 и RD), приобретенных в НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, а также белки культивируемых нормальных миобластов человека, любезно предоставленных Т.Б. Крохиной, выведенных как описано ранее [19].

Приготовление белковых экстрактов, их фракционирование методом двумерного электрофореза по О'Фарреллу, визуализацию белков окрашиванием Кумасси голубым R-250 и азотнокислым серебром и анализ полученных двумерных электрофореграмм (ДЭ) выполняли как описано ранее [20, 21]. Кроме того, применяли технологию двумерного электрофореза, включающую изоэлектрофокусирование с использованием иммобилинового градиента pH (IPG-PAGE) и комплекта оборудования Ettan IPGphor 3 фирмы «GE Healthcare» (Швеция) по протоколу фирмы-производителя. Идентификацию белков методами MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) и MS/MS (tandem mass spectrometry) проводили на MALDI-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex («Bruker», Германия) с УФ-лазером (336 нм) в режиме положительных ионов в диапазоне масс 500–8000 Да с калибровкой их по известным пикам аутолиза трипсина и с последующим применением программы Mascot, опция Peptide Fingerprint («Matrix Science», США) [21, 22]. Белки идентифицировали путем поиска совпадений значений экспериментальных масс с массами белков, аннотированных в базах данных (NCBI Protein и SwissProt/TrEMBL). Точность измеренных моноизотопных масс в рефлекто-моде после докалибровки по пикам аутолиза трипсина составляла 0.005%, точность измеренных масс фрагментов – ± 1 Да. Для выявления гипотетических белков, соответствующих фрагментам идентифицированных с помощью MALDI-TOF MS полноразмерных белков – продуктов соответствующих генов, проводили тандемную масс-спектрометрию. Молекулярные массы белковых фракций определяли с использованием наборов высокоочищенных рекомбинантных белков SM0661 (10–200 кДа) и SM0671 (10–170 кДа) («Fermentas», США). Денситометрию ДЭ и/или их отдельных фрагментов проводили после сканирования (сканер Epson expression 1680) или съемки на цифровую фотокамеру (Nikon 2500 или Canon PowerShot A1000 IS). Компьютерную обработку изображений с денситометрией белковых фракций выполняли с помощью пакета программ Melanie ImageMaster, версий 6 и 7 («Genebio», Швейцария).

Сбор и обработку данных для заполнения многоуровневой компьютерной базы данных «Протеомика рака простаты» осуществляли с использованием

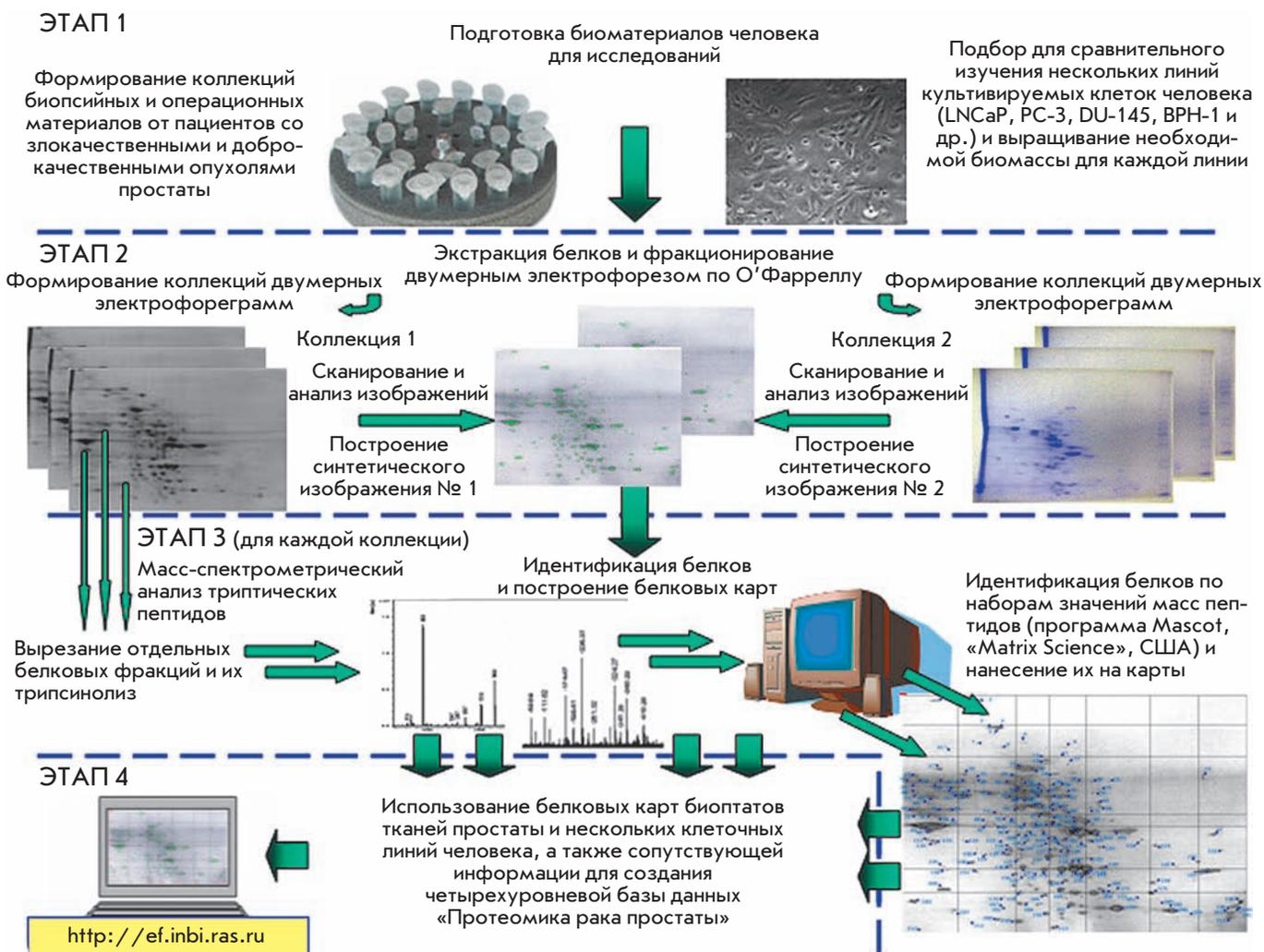


Рис. 1. Основные этапы протеомного изучения белков образцов тканей простаты, полученных от больных злокачественными и доброкачественными опухолями, а также белков из нескольких линий культивируемых клеток человека.

программ MapThis!, Molly Pinguin Software и пакета программного обеспечения Mozilla Firefox, а также других программных средств, в частности, входящих в набор Microsoft Office. Поставленные задачи выполняли при помощи интерактивной базы данных на основе СУБД MySQL с соответствующей Web-структурой, позволяющей в режиме on-line вносить и редактировать данные с любого компьютера, подключенного к сети Интернет. Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакетов программ BIOSTAT и Microsoft Office Excel 2003.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В соответствии с традиционной стратегией протеомных исследований, которая сложилась в конце XX

века, формирование отечественного информационного ресурса «Протеомика рака простаты» осуществлялось в виде нескольких последовательных этапов системного изучения белков в образцах тканей простаты, полученных от больных злокачественными и доброкачественными опухолями (рис. 1) (по [23, 24]). Кроме того, как видно из рис. 1, параллельно изучены белки из нескольких линий культивируемых клеток человека.

Первый этап этой стратегии – составление коллекции ДЭ белковых препаратов (не менее 50), полученных при фракционировании нескольких десятков биоптатов или образцов тканей простаты различных больных (не менее 30 человек). На рис. 2а представлена типичная ДЭ белков биопсийного образца тканей простаты с РП. При изучении белков клеточных

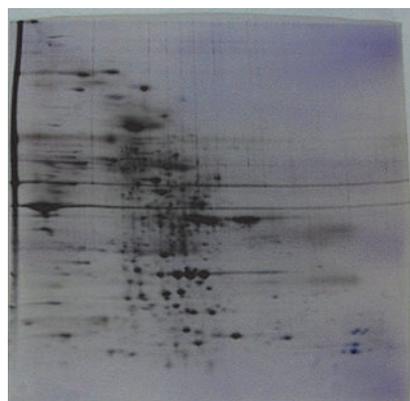
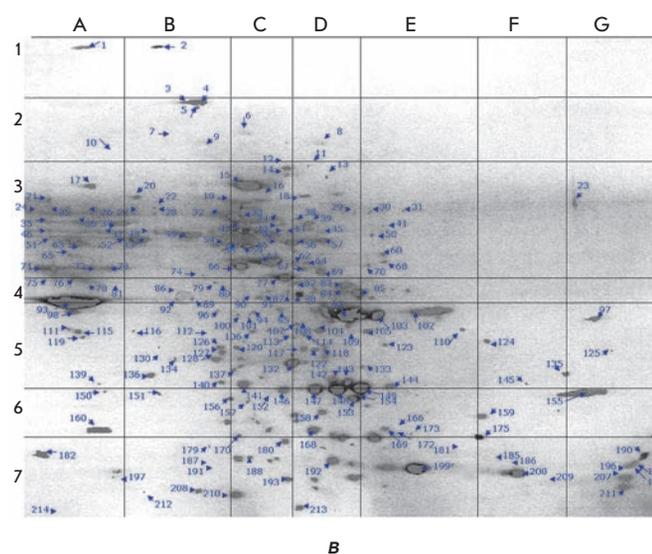
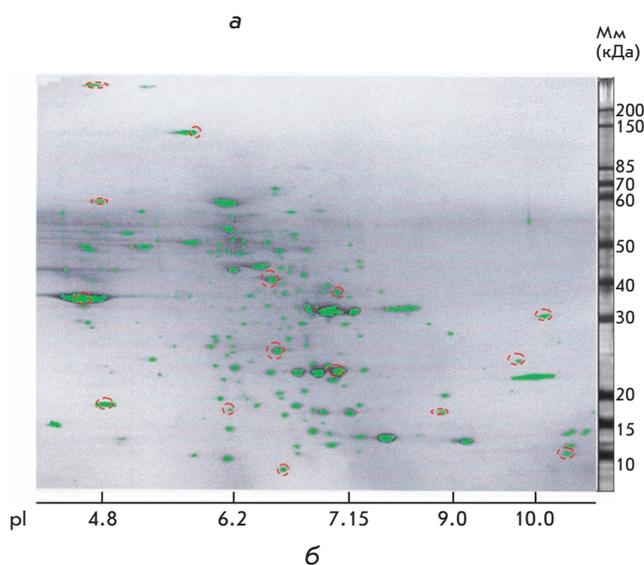


Рис. 2. Результаты протеомного изучения белков образцов раковых тканей простаты. а – Типичная ДЭ белков биопсийного образца тканей простаты с РП. б – Синтетическое изображение ДЭ белков биопсийного образца тканей простаты с РП; фракции, служившие реперными точками, выделены красными овалами, справа показано расположение маркеров молекулярных масс, внизу – результаты определения изоэлектрических точек. в – Двумерная белковая карта, построенная на основе синтетического изображения ДЭ белков биопсийного образца тканей простаты с РП; синими стрелками показаны фракции, охарактеризованные по электрофоретическим свойствам.



линий, учитывая однородность анализируемого материала, соответствующие коллекции формировали из 20 ДЭ.

Далее распределение белковых фракций на каждой электрофореграмме документировали в виде изображения, которое регистрировали и сохраняли в виде графического файла формата *.tif. Полные изображения ДЭ и (в некоторых случаях) их отдельных участков получали по результатам сканирования и/или по данным цифровой фотографии. Адекватность отобранных для последующего анализа ДЭ оценивали в ходе предварительного сравнения результатов фракционирования белков. С этой целью использовали метод компьютерного «наложения изображений» [23, 24].

Вторым этапом стало построение синтетических двумерных карт белков исследуемых объектов. Изображения ДЭ, имевшиеся в каждой коллекции, стандартизировали с помощью пакета программ Melanie ImageMaster по 15 выбранным реперным точкам, соответствовавшим четко идентифицируемым «мажорным» белковым фракциям. На рис. 2б в качестве

примера показаны соответствующие реперные точки на ДЭ белков из образцов тканей простаты.

Затем каждое изображение анализировали по методу Камингса [25] с некоторыми модификациями [20, 24]. Основой этого анализа стал общий принцип, предусматривавший разделение изображений на 49 условных прямоугольных участков (фрагментов), границы которых образовывали стандартным образом проведенные шесть горизонтальных и шесть вертикальных линий, а также края самой электрофореграммы. Точки для проведения горизонтальных линий находили с помощью специальных белков – маркеров молекулярных масс, которые наносили на каждую гелевую пластину перед проведением фракционирования во втором направлении (SDS-электрофорез в пластине градиентного полиакриламидного геля). Таким образом, белковые фракции, располагающиеся на соответствующих горизонтальных линиях, будут иметь одинаковые значения молекулярных масс. Для проведения условных вертикальных линий применяли разные белковые маркеры, для которых предварительно определяли

значения pI [20, 24]. Как следствие, каждое анализируемое изображение оказалось фрагментированным на 49 прямоугольных участков, на которых располагалось обычно не более 10 белковых фракций (лишь на четырех участках количество фракций превысило 20). Проведенная фрагментация изображений существенно облегчила последующее сопоставление изображений и построение синтетических двумерных карт.

Такую работу провели с 60 изображениями наиболее качественных ДЭ белков, полученных из гиперплазийных образцов, и с 70 электрофореграммами белков из раковых образцов. Результаты сравнения стандартизированных изображений ДЭ и при ДГП, и при РП показали, что в исследуемых образцах стабильны координаты пятен не менее чем 95% белковых фракций. Количественные и/или качественные вариации затрагивали не более 5% белковых фракций. По-видимому, вариабельность этих фракций могла быть обусловлена как непосредственными генетическими причинами (например, однонуклеотидным полиморфизмом), так и различиями в уровнях экспрессии соответствующих генов, а также особенностями тканевого состава исследуемых образцов и выраженностью патологического процесса.

Вывод о стабильности координат пятен позволил сформировать двумерные карты белков тканей простаты при ДГП и РП. Сформированные двумерные карты были подвергнуты сравнительному пофрагментному анализу. Паттерны распределения белковых фракций, представленных на двумерных картах ДГП и РП, оказались весьма схожими. Различие состояло в том, что на карте РП присутствовало около двух десятков белковых фракций, которые на соответствующих участках карты ДГП присутствовали или в значительно меньшем количестве, или не выявлялись вовсе. Эти белковые фракции рассматривались как особенно перспективные для дальнейшего изучения, результаты которого будут приведены ниже. В целом, проведенный анализ позволил построить суммарную синтетическую двумерную карту белков предстательной железы человека, на которую удалось нанести более 200 белковых фракций с параметрами Mm 8.5–450 кДа и pI 4.5–11.5 (рис. 2в). Каждая из этих фракций получила индивидуальный семизначный номер, в котором первые четыре цифры представляли собой значения десятичного логарифма экспериментально установленной молекулярной массы этой фракции, три последние – значения изоэлектрической точки в соответствии с номенклатурой, разработанной ранее [20, 24].

Аналогичным образом были построены другие синтетические карты белков культивируемых клеток человека, только их строили с использованием суще-

ственно меньшего количества изображений ДЭ в соответствующих коллекциях, как отмечалось выше.

Соответственно, каждая из построенных синтетических карт представляла собой информационный массив, отражающий полученные результаты об электрофоретических свойствах белковых фракций (в виде их распределения в системе прямоугольных координат) в каждом из изучавшихся объектов. Эти карты в виде графических файлов формата *.jpg с разрешением не менее 300 пикселей на дюйм составили первый уровень представления собранных материалов в формируемой компьютерной базе данных. Содержащаяся в них информация послужила основой для следующих этапов исследований и дальнейшего обобщения сведений об отдельных белках. Таким образом, синтетические карты стали своеобразными модулями, позволяющими формализовать и характеризовать биохимические свойства изучаемых белков. В целом, к настоящему времени в «ПРП» имеется семь соответствующих модулей (табл. 1). Для работы с модулями в «ПРП» предусмотрена специальная панель, позволяющая переходить от одного модуля к другому. Кроме того, модульные двумерные карты могут масштабироваться, и пользователь получает возможность под визуальным контролем пометать различные белки на картах, создавая специальные ссылки («кнопки») для перехода на следующие информационные уровни – второй, третий и четвертый, содержащие сведения об отдельных изучавшихся белках. В «ПРП» встроена также программа автоматического пересчета координат (по осям фракционирования в первом и вто-

Таблица 1. Модули в «ПРП» и идентифицированные в них белки

Модули – синтетические карты белков в исследуемых объектах (метод фракционирования)	Идентифицированные белки
Белки биоптатов предстательной железы (рак и гиперплазия)	165
Белки клеток LNCaP (IEF-PAGE*)	60
Белки клеток LNCaP (IPG-PAGE)	18
Белки клеток PC-3 (IEF-PAGE*)	25
Белки клеток ВРН-1 (IEF-PAGE*)	24
Белки клеток рабдомиосаркомы (IEF-PAGE*)	29
Белки нормальных миобластов человека (IEF-PAGE*)	38

*В модификации [20].

Общая схема организации базы данных «ПРП»
(на примере трех модулей с перекрестными ссылками)

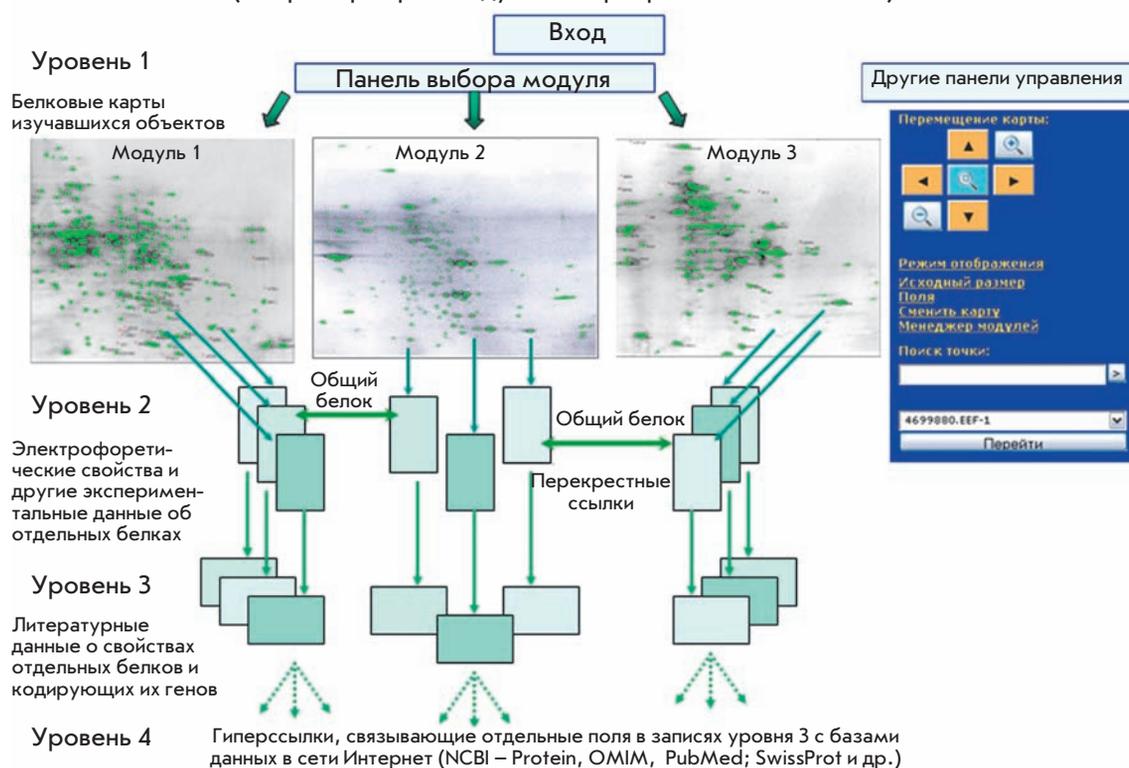


Рис. 3. Общая схема организации базы данных «Протеомика рака простаты» («ПРП»).

ром направлениях), осуществляемого при движении курсора по карте. Общая схема организации «ПРП» представлена на рис. 3.

Третьим этапом протеомных исследований, результаты которых были использованы при создании «ПРП», стали работы по идентификации отдельных белковых фракций. Белки идентифицировали в основном методами масс-спектрометрии. Результаты идентификации белков по отдельным модулям суммированы в табл. 1.

Как видно из табл. 1, общее количество идентифицированных белков в «ПРП» достигло 359. Среди них удалось выявить многие известные белки: ферменты гликолиза (глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа, триозофосфатизомераза и т.д.) и других метаболических процессов; цитоскелетные (актин, трансгелины и т.д.) и митохондриальные (порины, супероксиддисмутаза и т.д.) белки. Оказалось, что некоторые из идентифицированных белков в изучаемых объектах представлены несколькими изоформами, например трансгелины, что описано ранее [21, 22].

Особое внимание при идентификации, естественно, было обращено на те белковые фракции, которые качественно или количественно различались в образцах тканей простаты с ДГП и РП. Ранее уже сообщалось о предварительных результатах по иден-

тификации с помощью сравнительного протеомного анализа одного из потенциальных биомаркеров РП – белка AGR2 [14], недавно аналогичные данные получены для белка Dj-1 [26]. В целом, удалось выявить 17 потенциальных биомаркеров РП, часть из которых новые. Краткие сведения о потенциальных биомаркерах РП представлены в табл. 2. В качестве примера на рис. 4 показаны результаты масс-спектрометрической идентификации одного из новых потенциальных биомаркеров РП – белка PRO2675, в первичной структуре которого присутствует альбуминоподобный домен.

Для каждого идентифицированного белка (отмеченного «кнопкой» на соответствующей двумерной карте, как указано выше) формировался второй информационный уровень, представлявший собой стандартизованную систему из 15 полей для записи текстовой и графической информации, полученной в собственных исследованиях данной белковой фракции. В этой системе четыре поля предназначены для общих характеристик белка, шесть полей – для сведений о результатах идентификации и пять полей – для дополнительной информации. В качестве примера основные заполненные поля второго информационного уровня для одного из потенциальных биомаркеров РП – белка NANS (синтазы

Таблица 2. Потенциальные биомаркеры РП, включенные в модуль «Белки биопатов предстательной железы (гиперплазия, рак)» и другие модули «ПРП»

Универсальные номера*	Белок (некоторые синонимы и символ в «ПРП»)	Номера записей в базах данных (NCBI** и Swiss-Prot)	Дополнительная информация в «ПРП» и некоторые подтверждающие ссылки***
5653580	Комплекс легких цепей ферритина (К-(L)F)	182516, P02792	[15]
4785508 (4799550)	Шаперонин (HSPD1)	31542947, NP_002147, 118190, P10809	Обнаружен в клетках рабдомиосаркомы; {Bindukumar B. et al. 2008, 18646040}
4716560 (4756612)	Белок-дисульфидизомераза (ER60)	7437388, P30101	[15]
4531685	N-ацетилнейраминат-фосфат-синтаза (NANS)	12652539, AAN00008, NP_061819, 605202, Q9NR45	Обнаружен в клетках рабдомиосаркомы; [15]
4502675	Аннексин 2, изоформа 2 (ANXA2-i2)	4757756, NP_004030 151740, P07355	{Shiozawa Y. et al. 2008, 18636554; Hastie C. et al. 2008, 18211896}
4454692	Неизвестный белок PRO2675, содержащий альбуминовый домен (PRO2675)	7770217	[15]
4447605	Белок 29 эндоплазматического ретикулума, изоформа 1 (ERp29)	5803013, NP_006808, 602287, P30040	{Myung J.K. et al. 2004, 15598346}
4352630 (4342630)	Белок Dj-1 (Dj-1)	50513593, ISOA_A, 606324, Q99497	{Bindukumar B. et al. 2008, 18646040}
4356607 (4344615)	Белок Dj-1, электрофоретическая изоформа (Dj-1-ei)	31543380	
4336712 (4301795)	Простатический связывающий белок (нейрополипептид h3, РЕВР1)	21410340, AAN31102, 604591, P30086	[15]; {Li et al. 2008, 18161940; Woods Ignatoski K.M. et al. 2008, 18722266}
4286750 (4290620)	NM23В-белок, нуклеозиддифосфаткиназа В	4505409, NP_002503, 156491, P22392	{Johansson B. et al. 2006, 16705742}
4255880	Безымянный белок (NEDO human cDNA sequencing project, tissue type=«testis») (NEDO)	21758704, BAC05360	
4204630	Белок, связывающий жирные кислоты, изоформа 5 (E-FABP)	30583737, AAP36117, 605168, Q01469	[15]; {Morgan E.A. et al. 2008, 18360704}
4279900	AGR2 (AGR2)	37183136, AAQ89368, 606358, Q4JM47	[14, 15]; {Zhang J.S. et al. 2005, 15834940; Zweitzig D.R. et al. 2007, 17694278}
41811130	Гистон H3 семейства 3A (H3f3a)	55665435	[15]
4161675	Неизвестный белок PRO2044, содержащий альбуминовый домен (PRO2044)	6650826	[15]
4021610	S100 кальцийсвязывающий белок A11 (S100A11)	12655117, AAN01410, 603114, P31949	{Rehman I. et al. 2004, 15668896; Schaefer K.L. et al. 2004, 15150091}

*В скобках приведены номера модулей «Белки клеток LNCaP, модификация IEF-2DE».

**Номера из баз данных NCBI приведены в следующем порядке: Protein, Genbank и/или Nucleotide, OMIM.

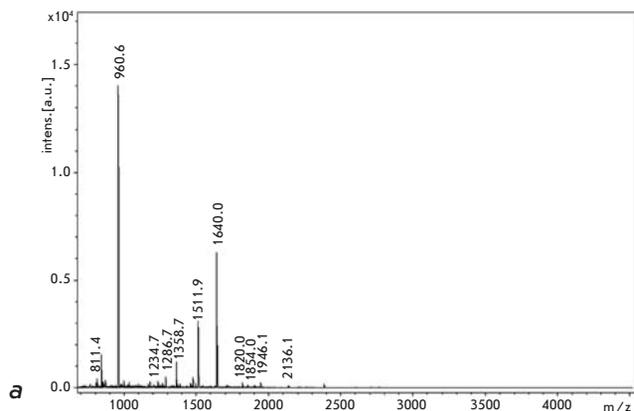
***В квадратных скобках – номера ссылок из Списка литературы, в фигурных скобках – ссылки и номера публикаций, имеющиеся в Интернет-базе данных PubMed.

Примечание. Жирным выделены обнаруженные новые для простаты потенциальные биомаркеры.

N-ацетилфосфатнейраминовой кислоты) – представлены на рис. 5.

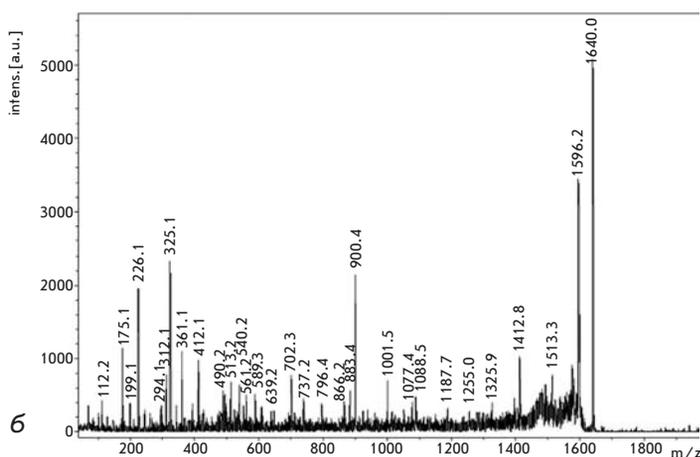
Поскольку один и тот же белок мог присутствовать в нескольких изучавшихся объектах, то на втором информационном уровне имеется возможность с помощью управляющей панели создавать перекрестные ссылки между одинаковыми белками в разных модулях. Такая панель для белка Dj-1 показана на рис. 6.

Подавляющее большинство из 359 идентифицированных фракций составляли известные белки (и/или их электрофоретические изоформы), о которых в литературе и различных базах данных накоплено множество разных сведений. Некоторые из этих сведений, подобранные с учетом задач «ПРП», составили третий информационный уровень. Этот уровень представляет собой стандартизированную систему из 23



Начало – Конец	Наблюдаемые Mr	Расчетные Mr	Последовательность пептида
1 - 16	1706.77	1705.82	MPADLPSLAADFVESK + Oxidation (M)
27 - 39	1639.82	1638.79	DVFLGMFLYEYAR + Oxidation (M)
76 - 92	2045.05	2044.09	VFDEFKPLVEEPQNLK
106 - 113	960.52	959.56	FQNALLVR
118 - 131	1511.74	1510.84	VPQVSTPTLVEVSR
249 - 263	1763.73	1762.77	AVMDDFAAFVEKCK + Oxidation (M)

a'



b

#	Immon.	a	a*	a ^o	b	b*	b ^o	Seq	v	w	w*	y	y*	y ^o	#
1	101.11	101.11	84.08		129.10	112.08		K							15
2	72.08	200.18	183.15		228.17	211.14		V	1467.78	1480.80		1511.84	1494.82	1493.83	14
3	70.07	297.23	280.20		325.22	308.20		P	1370.73	1369.73		1412.77	1395.75	1394.76	13
4	101.07	425.29	408.26		453.28	436.26		Q	1242.67	1241.67		1315.72	1298.70	1297.71	12
5	72.08	524.36	507.33		552.35	535.32		V	1143.60	1156.62		1187.66	1170.64	1169.65	11
6	60.04	611.39	594.36	593.38	639.38	622.36	621.37	S	1056.57	1055.57		1088.59	1071.57	1070.58	10
7	74.06	712.44	695.41	694.42	740.43	723.40	722.42	T	955.52	968.54	970.52	1001.56	984.54	983.55	9
8	70.07	809.49	792.46	791.48	837.48	820.46	819.47	P	858.47	857.47		900.51	883.49	882.50	8
9	74.06	910.54	893.51	892.53	938.53	921.50	920.52	T	757.42	770.44	772.42	803.46	786.44	785.45	7
10	86.10	1023.62	1006.59	1005.61	1051.61	1034.59	1033.60	L	644.34	643.34		702.41	685.39	684.40	6
11	72.08	1122.69	1105.66	1104.68	1150.68	1133.66	1132.67	V	545.27	558.29		589.33	572.30	571.32	5
12	102.05	1251.73	1234.70	1233.72	1279.73	1262.70	1261.72	E	416.23	415.23		490.26	473.24	472.25	4
13	72.08	1350.80	1333.77	1332.79	1378.79	1361.77	1360.78	V	317.16	330.18		361.22	344.19	343.21	3
14	60.04	1437.83	1420.80	1419.82	1465.83	1448.80	1447.82	S	230.12	229.13		262.15	245.12	244.14	2
15	129.11							R	74.02	73.03		175.12	158.09		1

b'

1 MPADLPSLAA DFVESKDVCK NYAEAKDVFL GMFLYEYARR HPDYSVLLLL RLAKTYETTL
 61 EKCCAAADPH ECYAKVFDEF KPLVEEPQNL IKQNCSELFQ LGEYKFQNAL LVRYTKKVPQ
 121 VSTPTLVEVS RNLGKVGSKC CKHPEAKRMP CAEDYLSVVL NQLCVLHEKT PVSDRVTKCC
 181 TESLVNRRPC FSALEVDETY VPKEFNAETF TFHADICTLS EKERQIKKQT ALVELVKHKP
 B 241 KATKEQLKAV MDDFAAFVEK CCKADDKETC FAEFGKKLVA ASQAALGL

Рис. 4. Результаты масс-спектрометрической идентификации белка PRO2675. а, а' – Масс-спектр триптических пептидов, полученный методом MALDI-TOF MS (а), и идентификация пептидов с помощью программы Mascot (а'). б, б' – Масс-спектр одного из триптических пептидов, полученный методом MALDI-TOF MS/MS (б), и его идентификация с помощью программы Mascot (б'). в – Аминокислотная последовательность белка PRO2675 (по записям AAF69644.1 GI:7770217 в базе данных Protein, NCBI); красными буквами показаны аминокислотные остатки выявленных пептидов; серым выделен пептид, последовательность которого установлена методом MALDI-TOF MS/MS; подчеркнутые участки последовательности соответствуют альбуминовому домену.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Экспериментальные данные (уровень 2)

Общие характеристики					
Фракция (белок)	N-ацетилнейраминат-фосфат-синтаза, NANS (N-acetylneuraminic acid phosphate synthase) Редактировать				
Локализация на ДЭ, номер	D4, 4531685 Редактировать				
Мм, кДа	38.0 Редактировать				
pI (наблюдаемая величина)	6.85 Редактировать				
Идентификация					
Метод	MALDI TOF MS Редактировать				
Совпадение масс выявленных триптических пептидов с последовательностью белка, %	58% Редактировать				
Анализ выявленных триптических пептидов программы Mascot («Matrix Science», США)	Начало-Конец	Наблюдаемые Mr	Расчетные Mr		Последовательность пептида
	66 – 74	1064.56	1063.55	1063.57	-0.02 0 ALERP YTSK
	87 – 96	1331.59	1330.58	1330.61	-0.03 0 HLEFSDQYR
	132 – 145	1540.68	1539.68	1539.72	-0.04 0 VGSGDTNNFPYLEK
	150 – 166	1919.79	1918.78	1918.83	-0.04 0 GRPMVISSGMQSM DTMK 4 Oxidation (M)
	199 – 205	866.44	865.43	865.45	-0.03 0 VISEYQK
	206 – 233	2767.42	2766.41	2766.50	-0.08 0 LFPPDIPIGYSGHETGIAISVAVALGAK
	247 – 264	1866.88	1865.87	1865.91	-0.04 0 GSDHSASLEPGE LAELVLR
	301 – 315	1693.83	1692.82	1692.87	-0.05 0 IPEGTILTMDMLTVK 2 Oxidation (M)
	321 – 333	1448.71	1447.70	1447.73	-0.04 0 GYPPE DIFNLV GK
	335 – 355	2401.08	2400.07	2400.14	-0.06 0 VLVTV EEDDTIMEELVDNHGK Oxidation (M)
	Редактировать				
Иллюстрация-1	Редактировать				
Аминокислотная последовательность (после удаления сигнальных последовательностей)	0001 MPLELELC PG RWVGGQHPCF IIAEIGQNHQ GDLDVAKRMI RMAKECGADC 0051 AKFQKSELEF KFNRRALERP YTSKHSWGKT YGENKRHLEF SHDQYRELQR 0101 YAEVGIFFFT ASGMDMAVE FLHELNV PFF KVGSGDTNNF PYLEKTAKKG 0151 RPMVISSGMQ SMDTMKQVYQ IVKPLNPNFC FLQCTSAYPL QPEDVNL RVI 0201 SEYQKLF PDI PIGYSGHETG IAISVAVAL GAKVLERHIT LDKTWKGS DH 0251 SASLEPGE LA ELVRSVRLVE RALGSPTRQL LPCEMACNEK LGKSVVAKVK 0301 IPEGTILTMD MLTVKVGEPK GYPPE DIFNLV VGKKVLV TVE EDDTIMEELV 0351 DNHGKKIKS				
	Редактировать				
Комментарий к аминокислотной последовательности	Аминокислотная последовательность белка NANS. Красным цветом выделены участки последовательности, соответствующие выявленным триптическим пептидам Редактировать				
Дополнительная информация по идентификации					
Дополнительная информация	MS/MS Fragmentation of VGSGDTNNFPYLEK Found in gi 8453156, N-acetylneuraminic acid phosphate synthase [Homo sapiens] Match to Query 16: 1539.695159 from(1540.702435,1+) Редактировать				
Тандемная масс-спектрометрия	Monoisotopic mass of neutral peptide Mr(calc): 1539.72 Ions Score: 22 Expect: 8.7				

Рис. 5. Основные поля второго информационного уровня для белка NANS.

Рис. 6. Управляющая панель с перекрестными ссылками для белка Dj-1 из модуля «Белки биоптатов предстательной железы (рак и гиперплазия)».

Белки-аналоги в других модулях

Модуль	Точка	Перейти	Отсоединить
Белки клеток LNCaP, IPG-2DE	4301630.Dj-1	Перейти	Отсоединить
Белки клеток LNCaP, модификация IEF-2DE	4342635.Dj-1	Перейти	Отсоединить
Белки клеток рабдомиосаркомы	4342690.Dj-1	Перейти	Отсоединить
Белки клеток PC-3	4342630.Dj-1	Перейти	Отсоединить
Добавить			

полей для записи текстовой и графической информации. Из них 12 полей предназначены для сведений о самом белке, шесть – о кодирующем его гене, три – о различных проявлениях полиморфизма и два поля – для специально отобранных ссылок на публи-

кации об этом белке как общего характера, так и онкологической направленности (рис. 7).

Поля для текстовой информации третьего уровня обеспечены возможностью вставки гиперссылок, связывающих эти поля с различными базами данных

Литература	
Общие публикации	<p>PMID: 9790916 1. Thompson, D.A. Weigel, R.J. hAG-2, the human homologue of the <i>Xenopus laevis</i> cement gland gene XAG-2, is coexpressed with estrogen receptor in breast cancer cell. <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> 1998. V. 251(1). P. 111–116.</p> <p>PMID: 12975309 2. Clark, H.F., Gurney, A.L., Abaya, E., Baker, K., Baldwin, D., Brush, J., Chen, J., Chow, B., Chui, C., Crowley, C., Currell, B., Deuel, B., Dowd, P., Eaton, D., Foster, J., Grimaldi, C., Gu, Q., Hass, P.E., Heldens, S., Huang, A., Kim, H.S., Klimowski, L., Jin, Y., Johnson, S., Lee, J., Lewis, L., Liao, D., Mark, M., Robbie, E., Sanchez, C., Schoenfeld, J., Seshagiri, S., Simmons, L., Singh, J., Smith, V., Stinson, J., Vagts, A., Vandlen, R., Watanabe, C., Wieand, D., Woods, K., Xie, M.H., Yansura, D., Yi, S., Yu, G., Yuan, J., Zhang, M., Zhang, Z., Goddard, A., Wood, W.L., Godowski, P., Gray, A. The secreted protein discovery initiative (SPDI), a large-scale effort to identify novel human secreted and transmembrane proteins: a bioinformatics assessment. <i>Genome Res.</i> 2003. V. 13(10). P. 2265–2270.</p> <p>PMID: 15340161 3. Zhang Z, Henzel WJ. Signal peptide prediction based on analysis of experimentally verified cleavage sites. <i>Protein Sci.</i> 2004. V. 13(10). P. 2819–2824.</p>
	<p>Редактировать</p>
	<p>PMID: 12592373 1. Fletcher G.C., Patel S., Tyson K., Adam P.J., Schenker M., Loader J.A., Daviet L., Legrain P., Parekh R., Harris A.L., Terrett J.A. hAG-2 and hAG-3, human homologues of genes involved in differentiation, are associated with oestrogen receptor-positive breast tumours and interact with metastasis gene C4.4a and dystroglycan. <i>Br. J. Cancer.</i> 2003. V. 88(4). P. 579–585.</p> <p>PMID: 15532095 2. Kristiansen G., Pilarsky C., Wissmann C., Kaiser S., Bruemendorf T., Roepcke S., Dahl E., Hinzmann B., Specht T., Pervan J., Stephan C., Loening S., Dietel M., Rosenthal A. Expression profiling of microdissected matched prostate cancer samples reveals CD166/MEMD and CD24 as new prognostic markers for patient survival. <i>J. Pathol.</i> 2005. V. 205(3). P. 359–376.</p> <p>PMID: 15867376 3. Liu D., Rudland P.S., Sibson D.R., Platt-Higgins A., Barraclough R. Human homologue of cement gland protein, a novel metastasis inducer associated with breast carcinomas. <i>Cancer Res.</i> 2005. V. 65(9). P. 3796–3805.</p> <p>PMID: 15958538 4. Smirnov D.A., Zweitzig D.R., Foulk B.W., Miller M.C., Doyle G.V., Pienta K.J., Meropol N.J., Weiner L.M., Cohen S.J., Moreno J.G., Connelly M.C., Terstappen L.W., O'Hara S.M. Global Gene Expression Profiling of Circulating Tumor Cells. <i>Cancer Res.</i> 2005. V. 65. P. 4993–4997.</p> <p>PMID: 15834940 5. Zhang J.S., Gong A., Cheville J.C., Smith D.J., Young C.Y. AGR2, an androgen-inducible secretory protein overexpressed in prostate cancer. <i>Genes Chromosomes Cancer.</i> 2005. V. 43(3). P. 249–259.</p> <p>PMID: 17022460 6. Kovalev L.I., Shishkin S.S., Khasigov P.Z., Dzeranov N.K., Kazachenko A.V., Kovaleva M.A., Toropygin I.Yu., Mamykina S.V. Identification of AGR2 protein, a novel potential cancer marker, using proteomics technologies. <i>Prikl Biokhim Mikrobiol.</i> 2006. V. 42(4). P. 480–484. (Ковалев Л.И., Шишкин С.С., Хасигов П.З., Дзеранов Н.К., Казаченко А.В., Ковалева М.А., Торопыгин И.Ю., Мамыкина С.В. Идентификация белка AGR2 – нового потенциального маркера рака с использованием протеомных технологий. <i>Приклад. биохимия и микробиол.</i> 2006. Т. 42. № 4. С. 480–484).</p> <p>PMID: 18829536 7. Ramachandran V., Arumugam T., Wang H., Logsdon C.D. Anterior gradient 2 is expressed and secreted during the development of pancreatic cancer and promotes cancer cell survival. <i>Cancer Res.</i> 2008. V. 68(19). P. 7811–7818.</p> <p>Редактировать</p>
Публикации онкологической направленности	

Рис. 7. Поля третьего уровня для специально отобранных ссылок на публикации о белке AGR2.

в Интернете, в частности Protein, OMIM и PubMed, входящими в базу знаний NCBI, а также SwissProt. Благодаря этому был сформирован четвертый информационный уровень, позволяющий пользователю оперативно и эффективно привлекать материалы ряда современных международных баз данных, содержащих, в частности, результаты секвенирования генома человека.

База данных «ППП» выполнена в виде интерактивного Web-ресурса на основе СУБД MySQL, расположенного по адресу <http://ef.inbi.ras.ru>, и соответственно доступна для посещения с любого компьютера, подключенного к сети Интернет с использованием браузеров типа Mozilla Firefox и Microsoft Internet Explorer. Вместе с тем, обеспечено и разграничение

прав доступа на три категории: «Гость», «Менеджер», «Администратор». Для каждой категории четко определена сфера возможных работ с «ППП». В частности, пользователи с правом доступа «Менеджер» обладают возможностями оперативно вносить записи в имеющиеся поля второго и третьего уровней, а также корректировать соответствующие записи, а пользователи с правом доступа «Администратор», кроме того, могут расширять базу данных за счет создания новых дополнительных модулей и новых функциональных элементов. Пользователь с правами «Гостя» имеет доступ к просмотру всех полей базы данных без возможности их редактирования.

Таким образом, в результате проведенных исследований создан оригинальный многомодульный

отечественный информационный ресурс «Протеомика рака простаты», в котором суммированы данные о белках, присутствующих в тканях простаты при ДГП и РП, а также о белках из нескольких клеточных линий человека, что открывает широкие возможности для дальнейшей работы с протеомной и другой биохимической информацией. Можно надеяться, что использование «ПРП» биохимики и другими специалистами, занятыми решением био-

медицинских проблем РП, будет способствовать повышению эффективности проводимых исследований и, в частности, активизирует поиски новых биомаркеров этого заболевания. ●

Исследования проводились при поддержке Департамента науки и промышленной политики города Москвы (государственные контракты № 8/3-373н-08 и 8/3-375н-08).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gottlieb B., Beitel L.K., Wu J.H., Trifiro M. // Hum. Mutat. 2004. V. 23. P. 527–533.
- Westbrook J.A., Wheeler J.X., Wait R., Welson S.Y., Dunn M.J. // Electrophoresis. 2006. V. 27. P. 1547–1555.
- Kandasamy K., Keerthikumar S., Goel R., Mathivanan S., Patankar N., Shafreen B., Renuse S., Pawar H., Ramachandra Y.L., Acharya P.K., Ranganathan P., Chaerkady R., Keshava Prasad T.S., Pandey A. // Nucleic Acids Res. 2009. V. 37 (Database issue). P. D773–D781.
- Vizcaino J.A., Cote R., Reisinger F., Barsnes H., Foster J.M., Rameseder J., Hermjakob H., Martens L. // Nucleic Acids Res. 2010. V. 38 (Database issue). P. D736–D742.
- Stamey T.A., Caldwell M., McNeal J.E., Nolley R., Hemenez M., Downs J. // J. Urol. 2004. V. 172. P. 1297–1301.
- Zhang J.S., Gong A., Cheville J.C., Smith D.I., Young C.Y. // Genes Chromosomes Cancer. 2005. V. 43. № 3. P. 249–259.
- Lim L.S., Sherin K. // Am. J. Prev. Med. 2008. V. 34. № 2. P. 164–170.
- Leman E.S., Getzenberg R.H. // J. Cell Biochem. 2009. V. 108. № 1. P. 3–9.
- Злокачественные новообразования в России в 2008 году. Заболеваемость и смертность / Ред. Чиссов В.И., Старинский В.В., Петрова Г.В. М.: МЕДпресс-информ, 2008. С. 18.
- Злокачественные новообразования в России и странах СНГ в 2002 г. ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН / Ред. Давыдов М.И., Аксель Е.М. М.: МИА, 2004. 256 с.
- Jemal A., Siegel R., Ward E., Murray T., Xu J., Smigal C., Thun M.J. // CA Cancer J. Clin. 2007. V. 57. № 1. P. 43–66.
- Maddams J., Brewster D., Gavin A., Steward J., Elliott J., Utley M., Muller H. // Br. J. Cancer. 2009. V. 101. № 3. P. 541–547.
- Примроуз С., Тваймен Р. Геномика. Роль в медицине. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2008. 277 с.
- Ковалев Л.И., Шишкин С.С., Хасигов П.З., Дзеранов Н.К., Казаченко А.В., Ковалева М.А., Торопыгин И.Ю., Мамыкина С.В. // Прикл. биохим. и микробиол. 2006. Т. 42. № 4. С. 480–484.
- Шишкин С.С., Дзеранов Н.К., Тотров К.И., Казаченко А.В., Ковалев Л.И., Еремина Л.С., Ковалева М.А., Торопыгин И.Ю. // Урология. 2009. № 1. С. 56–58.
- Коган М.И., Лоран О.Б., Петров С.Б. Радикальная хирургия рака предстательной железы. М.: Гэотар-Медиа, 2006. 392 с.
- Шишкин С.С., Ковалев Л.И., Ковалева М.А., Крахмалева И.Н., Еремина Л.С., Макаров А.А., Лисицкая К.В., Лоран О.Б., Велиев Е.И., Охриц В.Е. Проблемы ранней диагностики рака простаты и возможности применения новых потенциальных биомаркеров. (Информационно-методическое письмо). М.: ООО Оригинальная компания, 2009. 45 с.
- Черников В.Г., Терехов С.М., Крохина Т.Б., Шишкин С.С., Смирнова Т.Д., Лунга И.Н., Аднорал Н.В., Ребров Л.Б., Денисов-Никольский Ю.И., Быков В.А. // Бюлл. эксп. биол. мед. 2001. Т. 131. № 6. С. 680–682.
- Крохина Т.Б., Шишкин С.С., Раевская Г.Б., Ковалев Л.И., Ершова Е.С., Черников В.Г., Мирочник В.В., Бубнова Е.Н., Кухаренко В.И. // Бюлл. эксп. биол. мед. 1996. Т. 122. № 9. С. 314–317.
- Kovalyov L.I., Shishkin S.S., Efimochkin A.S., Kovalyova M.A., Ershova E.S., Egorov T.A., Musalyamov A.K. // Electrophoresis. 1995. V. 16. P. 1160–1169.
- Еремина Л.С., Ковалев Л.И., Шишкин С.С., Торопыгин И.Ю., Буракова М.И., Ковалева М.А., Макаров А.А., Дзеранов Н.К., Казаченко А.В., Тотров К.И., Кононков И.В., Лоран О.Б. // Вопр. биол. мед. фарм. химии. 2007. № 3. С. 49–52.
- Ковалева М.А., Ковалев Л.И., Еремина Л.С., Макаров А.А., Буракова М.В., Торопыгин И.Ю., Серебрякова М.В., Шишкин С.С., Арчаков А.И. // Биомедицинская химия. 2008. Т. 54. № 4. С. 420–434.
- Anderson N.G., Anderson L. // Electrophoresis. 1996. V. 17. P. 443–453.
- Шишкин С.С., Ковалев Л.И., Громов П.С. Функциональная геномика человека и протеомика, как раздел функциональной геномики // Многоликость современной генетики человека. М.-Уфа: Гилем, 2000. С. 17–50.
- Cummings D. // Clin. Chem. 1982. V. 28. P. 782–789.
- Loran O.B., Veliev E.I., Okhrizts V.E., Lisitskaya K.V., Eremina L.S., Kovalyov L.I., Kovalyova M.A., Shishkin S.S. // Eur. Urol. Suppl. 2010. V. 9. № 2. P. 309.

УДК 571.27

Новый подход к созданию антиканцерогенных вакцин

А. Н. Глушков¹, С. В. Апалько^{1*}, М. Л. Филипенко^{1,2}, В. А. Матвеева^{1,2}, А. Ю. Бакулина¹, В. Г. Лунин³, М. В. Костялко^{1,4}

¹Учреждение Российской академии наук Институт экологии человека Сибирского отделения РАН, 650065, Кемерово, просп. Ленинградский, 10

²Учреждение Российской академии наук Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН, 630090, Новосибирск, просп. Лаврентьева, 8

³Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

⁴Кемеровский государственный университет, 650043, Кемерово, ул. Красная, 6

*E-mail: apalko@ngs.ru

Поступила в редакцию 07.10.2010 г.

РЕФЕРАТ Воздействие определенных химических веществ (канцерогенов) на организм человека считается одним из главных этиологических факторов, приводящих к возникновению онкологических заболеваний. В представленной работе рассмотрен новый подход к созданию антиканцерогенных вакцин. Основная задача данного исследования состояла в получении пептида-иммуномиметика бензо[а]пирена, способного индуцировать специфические антиканцерогенные антитела, в качестве гаптен-специфического компонента антиканцерогенной вакцины. С этой целью синтезированы конъюгаты канцероген-белок, получены моно- и поликлональные антитела к бензо[а]пирену, при помощи технологии фагового дисплея осуществлен поиск пептида-иммуномиметика бензо[а]пирена и изучены его иммунологические свойства. Установлено, что структура пептида-иммуномиметика, позволяющая мимикрировать химические канцерогены группы полициклических ароматических углеводородов, возможна лишь в контексте рIII белка бактериофага M13. В связи с этим получен рекомбинантный белок, состоящий из пептида-иммуномиметика бензо[а]пирена и белка рIII. С помощью ИФА показано, что рекомбинантный белок специфически реагирует с моноклональными антителами В2 к бензо[а]пирену. При помощи молекулярного моделирования определена пространственная структура активного центра моноклональных антител В2 и проанализированы особенности его взаимодействия с полициклическими ароматическими углеводородами и, главным образом, с пептидом-иммуномиметиком бензо[а]пирена. Комплексный анализ результатов получения гаптен-специфического компонента антиканцерогенной вакцины позволил определить дальнейшую стратегию развития данного направления.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА бензо[а]пирен, антиканцерогенные вакцины, пептид-иммуномиметик, фаговый дисплей, молекулярное моделирование.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ CBD – целлюлозосвязывающий домен; OD – оптическая плотность; АТ – антитела; БП – бензо[а]пирен; БСА – бычий сывороточный альбумин; ИФА – иммуноферментный анализ; МАТ – моноклональные антитела; ПАУ – полициклические ароматические углеводороды.

ВВЕДЕНИЕ

По данным ООН рак уносит ежегодно около 8 млн жизней. Эта неутешительная статистика привела к развитию нового терапевтического направления в онкологии – разработке противоопухолевых вакцин. К сожалению, такие вакцины обычно направлены на борьбу с уже возникшим заболеванием, а не с его причиной.

По данным ВОЗ, в 90% случаев возникновение рака обусловлено воздействием канцерогенов окру-

жающей среды. Основная часть этих канцерогенов (70–80%) – химические вещества, в том числе повсеместно распространенные полициклические ароматические углеводороды (ПАУ). Считается, что выявление соединений, обладающих канцерогенной активностью, и полное устранение их из сферы жизнедеятельности человека – эффективный путь профилактики опухолей. Однако в силу многих обстоятельств применение такого подхода практически невозможно. В связи с этим представляется необхо-

димым создание антиканцерогенной вакцины, способствующей повышению иммунологической защиты организма человека и животных от влияния химических канцерогенов.

Химические канцерогены, будучи низкомолекулярными соединениями, не способны сами по себе индуцировать иммунный ответ. В 1937 г. Creech и Franks впервые синтезировали конъюгаты канцерогенов с высокомолекулярными носителями – белками сыворотки животных. Они установили, что иммунизация животных такими конъюгатами активирует синтез специфических антиканцерогенных антител (АТ). Тогда же было обнаружено некоторое угнетение развития опухолей, индуцированных канцерогенами, после предварительной иммунизации, и впервые высказана идея о возможном применении такого подхода к предупреждению раковых заболеваний у человека [1].

Следующий шаг в разработке антиканцерогенных вакцин сделали Moolten и соавт. в 1981 г. Они конъюгировали с белком не канцероген, а его структурный аналог, не обладающий способностью индуцировать опухоль. Предварительная иммунизация животных таким конъюгатом значительно снижала возникновение опухолей под воздействием явного канцерогена [2].

Принципиально новый подход использовали Chagnaud и соавт. В 1992 г. они сообщили о получении моноклонального антиидиотипического АТ к бензо[а]пирену (БП). Вторые, антиидиотипические АТ несут в себе «внутренний образ» канцерогена и способны индуцировать синтез первых АТ к канцерогену без использования конъюгатов канцероген-белок. В 1993 г. они описали ингибирующее действие вторых антител на возникновение химически индуцированных опухолей [3].

Начиная с середины 1980-х гг. Silbart и соавт. сконцентрировали свои усилия на индукции специфических секреторных АТ в слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта и бронхолегочной системы путем комбинации конъюгатов канцероген-белок с различными адъювантами для создания барьера на пути канцерогена из окружающей среды внутрь организма. В обзорной статье 1997 г. Silbart прямо ставит вопрос о будущем применении антиканцерогенных вакцин у человека [4].

Учитывая то, что препараты конъюгатов канцерогенов или их аналогов с белками-носителями могут приводить к ятрогенной индукции опухолей, а введение антиидиотипических АТ – вызывать аллергические и аутоиммунные заболевания, предложенные подходы неприменимы для создания антиканцерогенных вакцин для человека и животных.

Мы предлагаем принципиально новый подход к созданию антиканцерогенной вакцины. В качестве гаптен-специфического компонента предполагается

использовать пептид, способный индуцировать специфические антиканцерогенные АТ. В связи с тем, что БП является одним из самых активных и распространенных в окружающей среде соединений группы ПАУ, а также безусловным канцерогеном для человека, основная цель исследования состояла в получении пептида-иммуномиметика БП.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез конъюгатов

Конъюгаты ПАУ-белок: конъюгаты БП, бенз[а]антрацена, антрацена, хризена, пирена (Aldrich, Германия) синтезировали методом ковалентного связывания альдегидной группы гаптена с аминоклассами белка-носителя, в качестве которого использовали либо бычий сывороточный альбумин (БСА), либо гексокиназу [5].

Конъюгаты пептид-кБСА: к 700 мкл раствора, содержащего 2 мг катионизированного БСА (кБСА) [6], добавляли 2 мг синтетического пептида и 10 мг 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимидрохлорида (EDC), инкубировали в течение 2 ч, а затем проводили диализ раствора против H₂O (1 л) в течение 24 ч с шестикратной сменой воды.

Иммунизация лабораторных животных

Получение гибридомы, продуцирующей мАТ, специфичное к БП: гибридомы получали посредством слияния клеток мышшиной миеломы Sp2/0 и спленоцитов самок мышей линии Balb/c, иммунизированных конъюгатом БП-БСА [7], по протоколу, описанному Kohler G. и Milstein C. [8].

Получение поликлональных АТ к БП: кроликов иммунизировали 2 мг конъюгата БП-БСА внутримышечно еженедельно в течение 3 недель. Первую иммунизацию проводили в смеси с полным адъювантом Фрейнда (Sigma, США), вторую – антигеном с неполным адъювантом Фрейнда, а заключительную – антигеном в забуференном физиологическом растворе. Затем каждые 2 недели проводили поддерживающие инъекции. Кровь забирали через 2 мес. после начала иммунизации 1 раз в 2 недели.

Иммунизация животных химерным белком, содержащим пептид-иммуномиметик БП: мышшиной линии Balb/c иммунизировали внутрибрюшинно препаратом химерного белка четырехкратно через каждые 2 недели. Первую иммунизацию проводили антигеном в смеси с полным адъювантом Фрейнда, последующие антигеном с неполным адъювантом Фрейнда. Количество вводимого антигена составляло 100–150 мг. Начиная с первой иммунизации, сыворотку крови мышшиной тестировали на присутствие специфических АТ к ПАУ.

Аффинную очистку АТ к БП проводили при помощи аффинной хроматографии на колонках ПАУ-гексокиназа-сефароза 4В [9]. Смена белка-носителя в составе конъюгата позволяла избежать предварительной очистки антисыворотки от сопутствующих АТ против белка-носителя, используемого при иммунизации (АТ против БСА).

Иммуноферментный анализ (ИФА)

Для выявления специфических АТ к ПАУ-БСА лунки полистирольных планшетов (Медполимер, Россия) сенсibilизировали 100 мкл конъюгата ПАУ-БСА (5 мкг/мл) в течение 12 ч при 4°C. Участки неспецифического связывания насыщали 0.5% раствором БСА в основном фосфатном буфере (PBS: 8 г NaCl, 0.2 г KCl, 2.68 г Na₂HPO₄ × 7H₂O, 0.24 г KH₂PO в 1 л воды, pH 7.2–7.4), после чего лунки инкубировали в течение 1 ч при 37°C со 100 мкл сыворотки крови иммунизированных животных, разведенных в PBS, содержащем 0.05% Tween-20 (PBST) и 0.5% БСА. Несвязавшийся материал удаляли с помощью PBST и PBS. Связавшиеся АТ выявляли конъюгатом АТ против суммарных Ig мыши с пероксидазой хрена (ЗАО «БИОСАН», Новосибирск), с последующим окрашиванием субстратным раствором ТМВ (Fluka, Швейцария). Оптическую плотность (OD) измеряли на микропланшетном ридере (ФФМ, Россия) при 450 нм.

Для выявления специфического связывания химерного белка с АТ к БП лунки полистирольных планшетов сенсibilизировали моно- или поликлональными АТ к БП (5 мкг/мл). После блокировки вносили по 100 мкл химерного белка, разведенного до нужной концентрации PBST с 0.5% БСА. После инкубации планшеты тщательно отмывали, а затем вносили по 100 мкл кроличьей сыворотки против целлюлозосвязывающего домена (CBD) с последующей инкубацией, после чего связавшиеся рекомбинантные белки выявляли конъюгатом АТ против IgG кролика с пероксидазой хрена как описано выше. Для оценки воспроизводимости результатов эксперимент повторяли 3 раза.

Конкурентный ИФА: лунки полистирольных планшетов сенсibilизировали конъюгатом БП-БСА (5 мкг/мл). После блокировки в лунки вносили смесь мАТ В2 постоянной концентрации с разным количеством конкурента (ПАУ или синтетических пептидов). Смесь мАТ В2 с конкурентом перед внесением в лунки инкубировали в течение 30 мин с мягким покачиванием при 37°C, общий объем смеси составлял 100 мкл. Все анализируемые образцы разбавляли PBST с 0.5% БСА. Планшеты инкубировали в течение 1 ч с мягким покачиванием при 37°C. После тщательной отмывки планшета PBST связавшиеся мАТ выявляли

конъюгатом АТ против IgG мыши с пероксидазой хрена как описано выше. Для оценки воспроизводимости результатов эксперимент повторяли 3 раза.

Процедуру аффинной селекции фаговой пептидной библиотеки проводили в соответствии с протоколом, прилагаемом к набору Ph.D-12™ (New England BioLabs) с дополнительными модификациями [10].

Химический синтез пептидов методом активированных эфиров в растворе выполнен в лаборатории органического синтеза ИХБФМ СО РАН.

Молекулярное моделирование

Оптимальные шаблоны для моделирования структуры АТ по гомологии подобраны с помощью сервера BLAST. Моделирование проводили в программе Modeller9v1. Молекулярный докинг осуществляли в программе AutoDock версии 4.0. Для построения модели пептида в составе белка рIII, использовали программу моделирования *de novo* Rosetta [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез конъюгатов ПАУ-белок для получения и анализа антител

Существенным недостатком известных методов конъюгации ПАУ-белок, в том числе и метода получения конъюгатов БП-белок, было образование в конечном продукте полимерных продуктов, что существенно уменьшало выход растворимой фракции и, как следствие, делало такой конъюгат непригодным для иммуноанализа. Поэтому основной задачей данного блока исследования стало получение хорошо растворимых конъюгатов гаптен-белок, содержащих минимальные количества полимерных продуктов, и устойчивых без специальных стабилизаторов.

Мы применили метод ковалентного связывания гаптена с белком, заключающийся в образовании азометиновой связи между альдегидной группой гаптена и аминокруппами белка [5]. Использование альдегида БП для синтеза конъюгатов с белками позволило достичь хороших результатов – получены сыворотки животных с высокими титрами АТ к БП. При этом иммунизация гаптенем на основе одного белка-носителя, например БСА, и последующее выявление АТ к этому же гаптenu на основе другого белка-носителя, например гексокиназы, оказалось высокоэффективным для анализа АТ к БП в прямом и конкурентном ИФА, а также для получения аффинно-очищенных АТ к ПАУ в одну стадию [9].

Получение и иммунохимическая характеристика моноклонального антитела к бензо[а]пирену

В настоящее время в мире имеется несколько мАТ против БП (США, Чехия, Япония), созданных, глав-

ным образом, с целью разработки тест-систем ИФА для выявления загрязняющих агентов группы ПАУ в среде и их метаболитов и аддуктов с ДНК в биологических жидкостях человека и животных [12–14]. Основным недостатком таких мАТ в случае получения гаптен-специфического компонента вакцины – недостаточная специфичность их связывания с БП по сравнению с неканцерогенными ПАУ. Кроме того, не изучена способность зарубежных мАТ связываться с гидрофобными эндобиотиками (стероидными гормонами) и ароматическими аминокислотами. Поэтому ключевым этапом настоящей работы стало получение высокоспецифичного мАТ к БП и анализ его перекрестного реагирования с другими соединениями группы ПАУ, стероидными гормонами и ароматическими аминокислотами.

Из полученных в результате гибридизации клонов мышинных гибридом был выбран клон В2, продуцирующий мАТ класса IgG, которое не взаимодействовало с конъюгатом антрацен-БСА, слабо взаимодействовало с конъюгатами хризен- и пирен-БСА. Наиболее эффективно мАТ В2 связывалось с БП и с бенз[а]антраценом, вероятным канцерогеном человека [7].

Исходя из предположения о том, что присутствие ароматического кольца является одним из условий взаимодействия АТ против ПАУ с другими соединениями, мы проверили возможность перекрестной реакции мАТ В2 с такими аминокислотами, как триптофан и фенилаланин. Известно, что в передаче сигнала от ПАУ и эндогенных субстратов, таких, как эстрогены, участвует один рецептор (aryl hydrocarbon receptor), поэтому изучили также перекрестное реагирование мАТ В2 с эстрогенами и не выявили связывания мАТ В2 с указанной группой соединений, это исключает вероятность получения антиканцерогенной вакцины с такими нежелательными побочными эффектами, как индукция аутоиммунных реакций против эндогенных лигандов.

Получение и характеристика пептида-иммуномиметика бензо[а]пирена

Для поиска пептида-иммуномиметика БП мы использовали технологию фагового дисплея. Процедура аффинной селекции включала инкубацию исходной библиотеки Ph.D-12™ с моно- и поликлональными АТ к БП, отмывку несвязавшихся и элюцию связавшихся с АТ бактериофагов. При этом предварительную процедуру истощения бактериофагов на интактных IgG мыши или кролика заменяли перекрестным картированием АТ в третьем раунде селекции, т.е. первые два раунда проводили на одновидовых АТ, например на мАТ В2, а в третьем раунде полученной популяцией бактериофагов картировали поликлональные АТ к БП, и наоборот. К тому же предложен-

ный подход должен был способствовать селекции высокоаффинных клонов бактериофагов.

В результате было получено пять клонов бактериофагов, специфически взаимодействующих с мАТ В2. При этом четыре клона получили в результате перекрестной селекции, когда два первых раунда проводили на мАТ В2, а последний на поликлональных АТ к БП; и один, когда все раунды селекции проводили на мАТ В2. Результаты секвенирования ДНК этих клонов с последующей трансляцией показали, что все пять клонов имели одинаковую аминокислотную последовательность рекомбинантного пептида – LeuHisLeuProHisHisAspGlyValGlyTrpGly [10, 15].

Для изучения иммунохимических свойств пептида-иммуномиметика БП был осуществлен его синтез (последовательность пептида условно обозначена PiP). В связи с тем, что сначала синтезировали половинки пептида, LeuHisLeuProHisHis (LH-пептид) и AspGlyValGlyTrpGly (DG-пептид), которые затем сшивали, оценивали также способность LH- и DG-пептидов специфически взаимодействовать с мАТ В2.

Предполагается, что структурная мимикрия ПАУ зависит от присутствия в составе пептида остатка триптофана, поэтому триптофан использовали в качестве отрицательного контроля.

Было установлено, что синтетические образцы пептидов конкурируют за связывание мАТ В2 с конъюгатом БП-БСА. Однако сила их связывания значительно ниже, чем у БП. Вместе с тем триптофан (Trp) не показал явной конкуренции за связывание с мАТ В2 (рис. 1). Это говорит о том, что Trp способен специфически связываться с АТ против химических канцерогенов группы ПАУ лишь в контексте с другими аминокислотными остатками данных пептидов.

Загадкой остается природа связывания LH-пептида с мАТ В2. Можно предположить, что взаи-

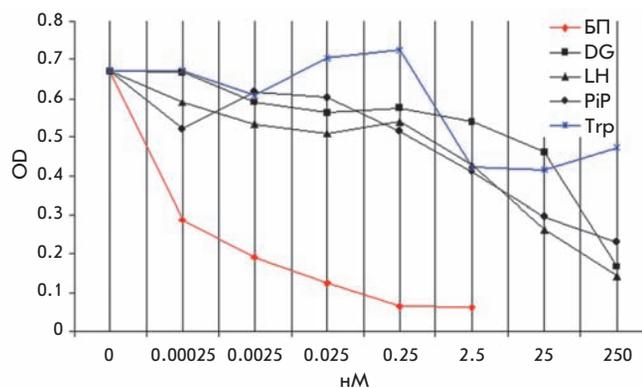


Рис. 1. Конкурентное ингибирование БП, DG, LH, PiP и Trp связывания мАТ В2 с иммобилизованным конъюгатом БП-БСА.

модействие пептида Р1Р с мАТ В2 носит сложный характер и не объясняется структурной мимикрией БП триптофаном или каким-то другим гидрофобным остатком.

Анализ сыворотки мышей, иммунизированных конъюгатами пептидов с кБСА, выявил присутствие АТ к бенз[а]антрацену и антрацену. Однако их уровень был на порядок ниже уровня АТ к ПАУ, индуцированных при иммунизации мышей БП-БСА [11].

В некоторых работах по получению пептидомиметиков низкомолекулярных соединений отмечается, что исходная конформация пептидов, презентруемых на поверхности несущего белка бактериофага, может изменяться в свободном пептиде и при любой дополнительной модификации. Такие изменения критичны для распознавания пептида АТ [16].

Поэтому нами с помощью программы Rosetta была построена модель пептида в составе белка рIII бактериофага М13. В модели боковой радикал триптофана оказался экспонированным на поверхности белка [11]. Вероятно, структура пептида-иммуномиметика, позволяющая мимикрировать химические канцерогены группы ПАУ, возможна лишь в контексте белка рIII. В связи с этим дальнейшая работа была направлена на получение рекомбинантного белка, состоящего из пептида-иммуномиметика БП и белка рIII бактериофага.

Получение и характеристика рекомбинантного белка, содержащего пептид-иммуномиметик бензо[а]пирена

Существует несколько генно-инженерных подходов, позволяющих повысить уровень экспрессии и стабильность чужеродных белков в бактериальной системе, облегчить процедуру тестирования и увеличить эффективность системы очистки данных белков. Один из них – fusion-технология – технология слитых (химерных) белков. Она основана на соединении в одной рамке трансляции двух генов (гена антигенного компонента и гена белка-носителя), что приводит к синтезу химерного белка в бактериальной системе [17].

С использованием fusion-технологии нами получен и охарактеризован химерный белок, антигенный компонент которого состоял из аминокислотных последовательностей пептида-иммуномиметика БП и белка рIII бактериофага М13, на основе которого сконструирована библиотека Ph.D-12™. В качестве белка-носителя использовали CBD-домен эндогликаназы *Anaerocellum thermophilum*, способный аффинно взаимодействовать с целлюлозным сорбентом, что позволило в одну стадию выделить и очистить рекомбинантный белок, содержащий пептид-иммуномиметик.

Методом неконкурентного ИФА изучили способность полученного химерного белка, состоящего из антигенного компонента (пептид-иммуномиметик БП в составе белка рIII) и белка-носителя (CBD), взаимодействовать с мАТ В2. В качестве отрицательного контроля использовали CBD. Установлена дозовая зависимость способности химерного белка, содержащего пептид-иммуномиметик, специфически связываться с адсорбированными на пластике мАТ В2 (рис. 2). При этом химерный белок не связывался с поликлональными мышиными и кроличьими АТ к БП.

Для выяснения того, способен ли пептид-иммуномиметик в составе рIII бактериофага индуцировать АТ против ПАУ, мышей линии Balb/c иммунизировали внутрибрюшинно химерным белком. В сыворотке крови иммунизированных мышей обнаружен низкий уровень АТ к ПАУ. Наиболее выраженным было связывание АТ с антраценом. В то же время в сыворотке крови мышей, иммунизированных рекомбинантным клоном бактериофага, содержащим в составе белка рIII пептид-иммуномиметик БП, обнаружены АТ к БП в титрах, сопоставимых с титрами в положительном контроле – иммунизация конъюгатом БП-БСА [10, 15].

Чтобы определить пути повышения иммуногенности химерного белка по отношению к БП при помощи молекулярного моделирования изучили пространственную структуру активного центра мАТ В2 и особенности его взаимодействия с ПАУ и с пептидом-иммуномиметиком.

Особенности взаимодействия мАТ В2 с пептидом-иммуномиметиком бензо[а]пирена

По установленным первичным структурам тяжелой и легкой цепей методом моделирования по гомологии была построена модель Fab-фрагмента мАТ В2. Средняя энергия связывания Fab-фрагмента мАТ В2 с рядом ПАУ, вычисленная с помощью программы молекулярного докинга, коррелировала с экспериментальными данными о перекрестной реактивности

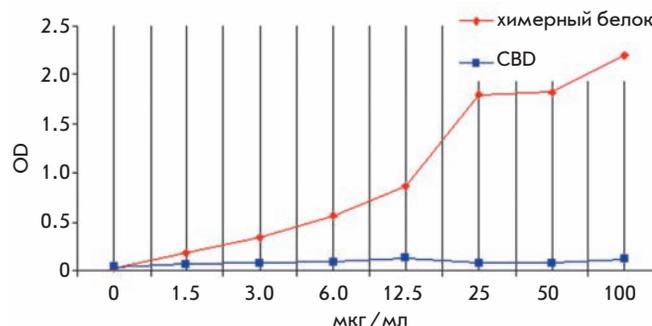


Рис. 2. Связывание химерного белка, содержащего пептид-иммуномиметик бензо[а]пирена, с мАТ В2.

сти мАТ В2 с этими же ПАУ, что подтверждает правильность построенной модели [11].

Методом молекулярного докинга определена возможность существования двух карманов в активном центре мАТ В2 для связывания ПАУ. При этом наилучшая позиция для связывания БП и ряда других ПАУ находилась между третьими петлями легкой и тяжелой цепей мАТ В2 (этот карман условно назван К1). Найдено два варианта расположения БП в кармане К1 – вертикальное и горизонтальное, первое и второе соответственно. Второй карман, находящийся между второй петлей легкой цепи и третьей петлей тяжелой цепи, был менее глубоким и, исходя из предсказанной докингом большей энергии связи, менее предпочтительным для связывания ПАУ (этот карман условно назван К2) [11].

С целью моделирования взаимодействия пептида LeuHisLeuProHisHisAspGlyValGlyTrpGly с мАТ В2 сделан ряд молекулярных докингов Fab-фрагмента мАТ В2 с трипептидами, составляющими РiР. Ни один из трипептидов не связался с АТ в районе первого кармана. Несколько трипептидов (HisLeuPro, LeuProHis, ProHisHis и GlyTrpGly) связались с АТ в районе второго кармана (рис. 3). При этом три трипептида объединяет присутствие незакрытого другими аминокислотами остатка гистидина. Это объясняет способность ЛН-пептида конкурировать за связывание мАТ В2 с конъюгатом БП-БСА.

В то же время очевидно, что триптофан, входящий в состав пептида-иммуномиметика БП, играет ключевую роль в связывании с мАТ В2 при условии его экспонирования на поверхности белка. Такая структура пептида-иммуномиметика возможна в составе белка рIII.

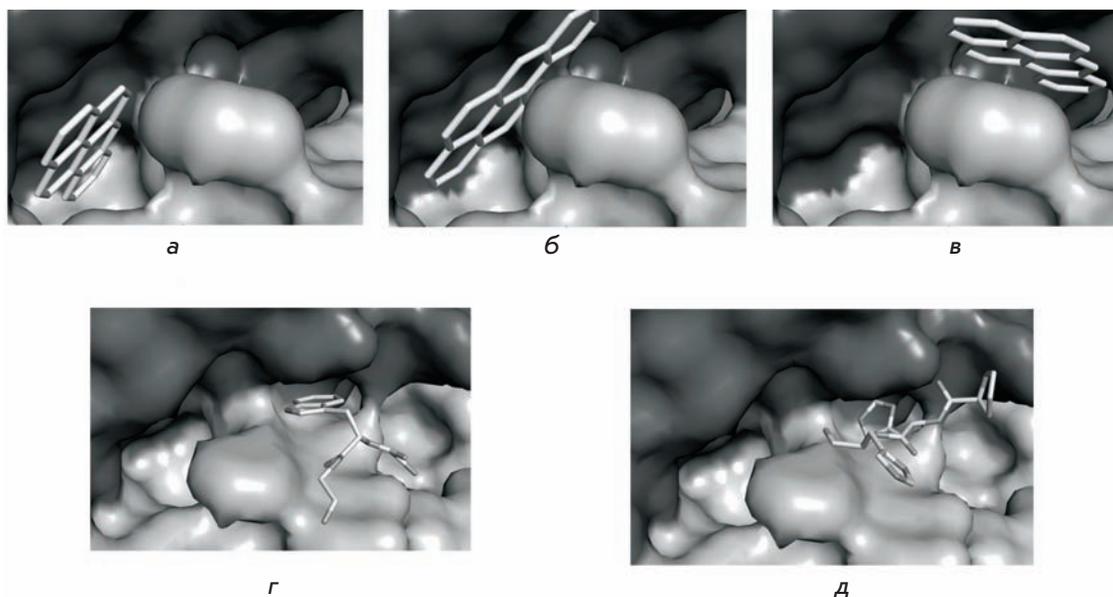
Если признать существование второго кармана связывания в активном центре мАТ В2, то можно объяснить и тот факт, что химерный белок, содержащий пептид-иммуномиметик, активно связывается только с мАТ В2, но не с другими, поликлональными, АТ к БП.

Скорее всего в процессе селекции рекомбинантных бактериофагов на мАТ В2 отбор пептидов шел по связыванию со вторым карманом, как с наиболее предпочтительным. Возможно, что исходная библиотека не содержала пептида, способного к специфическому связыванию с более глубоким первым карманом. На это указывает и то, что в популяции рекомбинантных бактериофагов, полученных в результате аффинной селекции на поликлональных АТ, не найдено клонов, способных к специфическому связыванию с мАТ В2, а также то, что все пять клонов имели одинаковую аминокислотную последовательность.

Выявленную в результате экспериментов *in vivo* слабую реверс-мимикрию, т.е. слабую иммунную реакцию с ПАУ АТ при иммунизации мышей химерным белком, можно объяснить следующим.

Как отмечено выше, из всех боковых радикалов аминокислот наибольшим структурным сходством с БП обладает боковой радикал триптофана. Наложение структур триптофана и БП в первом положении кармана К1 показывает, что в составе полипептидной цепи триптофан не может связаться с такой глубокой полостью, так как длина БП превышает длину бокового радикала триптофана. В то же время во втором положении кармана К1 возможна структурная мимикрия БП триптофаном в сочетании с каким-либо другим боковым радикалом аминокислотного остатка. Возможно, что часть АТ, индуцированных при иммунизации

Рис. 3. Докинг связывания мАТ В2 с БП, GlyTrpGly и ProHisHis. а – Связывание БП по первому положению в кармане К1. б – Связывание БП по второму положению в кармане К1. в – Связывание БП в кармане К2. г – Связывание GlyTrpGly в кармане К2. д – Связывание ProHisHis в кармане К2.



пептидом-иммуномиметиком, имеют полость для связывания по типу кармана K2, поэтому АТ, связывающие триптофан, в общем случае не будут связывать БП. Другая часть АТ может иметь полость для связывания по типу второго положения кармана K1, что позволяет им связывать ПАУ, в том числе и БП.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование конъюгатов химических канцерогенов (или их структурных аналогов) с макромолекулярными носителями в качестве вакцин для иммунопрофилактики злокачественных новообразований у человека абсолютно недопустимо ввиду риска индукции опухоли самим препаратом вакцины. Гибридная технология получения антиидиотипических АТ имеет ограничения в оптимизации иммуногенных свойств искомым вакцин, она сложная и дорогая.

Предлагаемый подход, а именно, получение пептидов-иммуномиметиков химических канцерогенов с помощью технологии фагового дисплея более предпочтителен.

Полученные нами МАТ В2 обладают высокой специфичностью к БП, низкой перекрестной реактивностью с неканцерогенными ПАУ, не реагируют с эндобиотиками. Более того, методом молекулярного докинга показано, что предсказанная средняя энергия связывания молекулы дибензо[а]пирена с моделью Fab-фрагмента МАТ В2 составляет -8.91 ккал/моль, что превышает эти значения как для БП, так и других ПАУ. Нами обнаружена прямая корреляция между предсказанной энергией связывания и экспериментально измеренной перекрестной реактивностью ПАУ. На этом основании можно предположить, что использование МАТ В2 в технологии фагового дисплея окажется эффективным при поиске пептидов-иммуномиметиков не только БП, но и других ПАУ с более высокой канцерогенной активностью.

Стоит отметить, что моноклональные антиидиотипические АТ были получены при иммунизации животных поликлональными АТ к БП [3]. В связи с этим дальнейшая стратегия предлагаемого нами подхода будет определяться использованием новых молекул-мишеней для поиска пептидов-иммуномиметиков ПАУ. Наиболее удачным, на наш взгляд, кажется использование в качестве молекулы-мишени рекомбинантного Fab-фрагмента МАТ В2 с удаленным при помощи точечного мутагенеза вторым карманом. Полученные в результате селекции на таком АТ рекомбинантные бактериофаги обязательно должны проверяться на связывание с поликлональными АТ к БП.

Вторым направлением повышения иммуногенности искомым вакцин по отношению к канцерогенным ПАУ станет использование других фаговых библиотек и/или оптимизация структуры рекомбинантного пептида путем точечных мутаций. Это позволит получить пептид, способный индуцировать высоко-специфичный иммунный ответ к БП и более канцерогенным ПАУ. ●

Авторы выражают благодарность за помощь в работе Е.А. Храпову, Л.Э. Матвееву, А.М. Ляцукку, В.Н. Сильникову, Е.А. Шериной, А.В. Аверьянову. Особую благодарность за поддержку и помощь в развитии данного направления авторы выражают академику Д.Г. Кнорре.

Работа выполнена при поддержке Государственного контракта (02.512.12.2044) в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы» и Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 10-04-98003).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Creech H.J., Oginsky E.L., Tryon M. // Cancer Res. 1947. V. 7. P. 301–304.
2. Moolten F.L., Schreiber B., Rizzone A. // Cancer Res. 1981. V. 41. P. 452–459.
3. Chagnaud J.L., Faiderbe S., Geffard M. // Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie. 1993. V. 316. P. 1266–1269.
4. Silbart L.K., Rasmussen M.V., Oliver A.R. // Vet. Hum. Toxicol. 1997. V. 39. № 1. P. 37–43.
5. Костянко М.В., Глушков А.Н. Патент № 2141114, РФ, 6 G 01 N 33/50, 1998.
6. Muckerheide A., Apple Raimond J., Pesce Amadeo J., Michale Gabriel J. // J. Immunol. 1987. V. 138. P. 833–837.
7. Глушков А.Н., Апалько С.В., Матвеева В.А., Костянко М.В., Черно С.В. // Росс. иммунол. журн. 2009. Т. 3. № 12. С. 30–38.
8. Kohler G., Milstein C. // Nature. 1975. V. 256. P. 495–497.
9. Glushkov A.N., Kostyanko M.V., Chernov S.V., Vasilchenko I.L. // Russian J. Immunology. 2002. V. 7. P. 41–46.
10. Глушков А.Н., Апалько С.В., Филипенко М.Л., Матвеева В.А., Храпов Е.А., Костянко М.В. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2008. Т. 3. С. 32–36.
11. Глушков А.Н., Апалько С.В., Бакулина А.Ю., Матвеева В.А., Храпов Е.А., Костянко М.В., Сильников В.Н., Филипенко М.Л. // Молекуляр. биология. 2010. Т. 44. С. 699–707.
12. Gomes M., Santella R.M. // Chem. Res. Toxicol. 1990. V. 3. P. 307–310.
13. Scharnweber T., Fisher M., Suchanek M., Knopp D., Niessner R. // Fresenius J. Anal. Chem. 2001. V. 371. P. 578–585.
14. Yamashita N., Nishama S. United State Patent № US 6,277,964 B1, 2001.
15. Глушков А.Н., Апалько С.В., Филипенко М.Л., Матвеева В.А., Храпов Е.А., Костянко М.В. Патент № 2357975, РФ, C07K 16/42, A61K 38/04, C12P 21/03, 2009.
16. Böttger V., Peters L.-E., Micheel B. // J. Mol. Recognit. 1999. V. 12. P. 191–197
17. Terpe K. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003. V. 60. P. 523–533.

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.

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 практиче-

ских 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: сносок (в том числе в таблицах), примечаний к таблице, подписей к рисункам, краткой аннотации, сокращений (мес. – месяц, г. – год, т. пл. – температура плавления), но не ставится в подстрочных индексах: $T_{пл}$ – температура плавления, $T_{ф.п}$ – температура фазового перехода. Исключение: млн – миллион – без точки.
- Десятичные цифры набираются только через точку, а не через запятую (0.25 вместо 0,25).
- Сокращения единиц измерений пишутся только русскими буквами (мкМ, но не μ М; нм, но не nm).
- Знак «–» (тире) отбивается пробелами, знаки «минус», «интервал» или «химическая связь» пробелами не отбиваются.
- В качестве знака умножения используется только «×». Знак «×» ставится только в том случае, если справа от него стоит число. Символом «·» обозначаются комплекс-

- ные 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 (А, Т, G, С, 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. 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 А. С. Исаевой, Е. Е. Куликова, К. К. Тарасян, А. В. Летарова «Новый метод высокоразрешающего геномного ПЦР – фингерпринтинга энтеробактерий», опубликованной в журнале «Acta Naturae», 2010, т. 2, № 1 (4), с. 89–94, допущена ошибка – дважды дана одна и та же фотография (на рис. 3 и рис. 4). Издатель приносит свои извинения.

Правильный рисунок 3 приведен ниже:

