

Письмо редакторов

Научные исследования в области живых систем невозможны без международной кооперации. Одной из важных составляющих нашего журнала стали обзоры ведущих отечественных и иностранных ученых. Наши авторы представляют лидирующие научные школы России, Европы и США.

Кроме того, на страницах издания в разделе экспериментальных статей публикуются результаты работ международных исследовательских групп. В частности, в этом номере мы предлагаем Вашему вниманию статью, подготовленную совместно с японскими коллегами и посвященную исследованиям процесса деацилирования ферментов семейства пенициллинсвязывающих белков. Еще одна методическая статья коллектива немецких ученых освещает возможности применения двумерного электрофореза для изучения рецепторного комплекса.

Одному из аспектов международного сотрудничества в области живых систем посвящен материал в разделе «Форум». Это статья о таможенных барьерах на пути развития биотехнологий и о возможных способах их преодоления.

Продолжая тему поддержки государством отечественной науки, начатую в предыдущем номере (*Acta Naturae*, 2010, том 2, № 1 (4)), мы публикуем материал о реализации федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры».

Мы также спешим поделиться со своими читателями хорошей новостью: журнал «*Acta Naturae*» вошел в Перечень ведущих периодических изданий Высшей аттестационной комиссии Минобрнауки России. Надеемся, это привлечет к нам дополнительную аудиторию молодых исследователей. ●

Редакционная коллегия

Наука и технологии России – STRF.ru



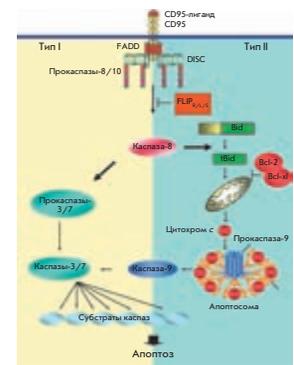
- 40% учёных согласны с тем, что публикации о результатах научной работы способствуют просвещению общества, росту престижа профессии учёного, улучшению имиджа науки
- 34% считают, что, распространяя информацию о результатах своей работы, они смогут привлечь клиентов, партнёров, деньги
- 12% надеются,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

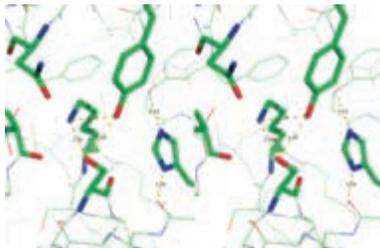
Д. Риесс, И. Н. Лаврик

Применение метода двумерного электрофореза для изучения состава рецепторного комплекса, образуемого на CD95/Fas

С помощью метода двумерного электрофореза проанализированы комплексы DISC в клетках двух типов, различающихся скоростью индукции апоптоза. Показано, что клетки обоих типов содержат такие основные компоненты комплекса DISC, как рецептор CD95, адаптерная молекула FADD и прокаспаза-8. Удалось выявить различия в составе рецепторного комплекса CD95, определяющего разную скорость инициации апоптоза.



Два типа передачи сигнала через рецептор CD95.



И. Г. Халиуллин, Д. А. Суплатов, Д. Н. Шалаева, М. Оцука, Я. Асано, В. К. Швядас

Биоинформатический анализ и молекулярное моделирование участка Lys65 в каталитической триаде D-аминопептидазы из *Ochrobactrum anthropi*

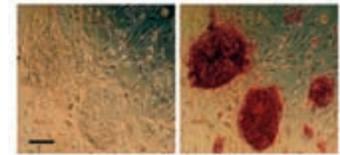
Стереоизображение активного центра D-аминопептидазы, показывающее структурную организацию каталитической триады.

Полученные данные позволили установить роль остатка Lys65 в механизме действия D-аминопептидазы как общего основания, ответственного за передачу протона от каталитического остатка Ser62 к остатку Tyr153 и обратно на стадиях образования и расщепления промежуточного ацилфермента.

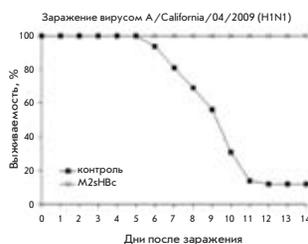
С. П. Медведев, А. А. Малахова, Е. В. Григорьева, А. И. Шевченко, Е. В. Дементьева, И. А. Соболев, И. Н. Лебедев, А. Г. Шилов, И. Ф. Жимулев, С. М. Закиян

Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток из фибробластов кожи плода человека

В данной работе проведено репрограммирование фибробластов кожи плода человека путем трансдукции ретровирусными векторами, несущими кДНК генов *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc* мыши. В результате получены клетки, обладающие характерными для эмбриональных стволовых клеток человека экспрессией белков и паттерном транскрипции генов.



Морфология колоний индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, полученных из эмбриональных фибробластов человека.



Динамика гибели мышей, иммунизированных M2sHBc частицами, после заражения вирусом гриппа.

Р. Ю. Котляров, В. В. Куприянов, А. И. Мигунов, Л. А. Степанова, Л. М. Цыбалова, О. И. Киселев, Н. В. Равин, К. Г. Скрябин

Разработка рекомбинантной вакцины против гриппа A(H1N1) 2009 на основе вирусоподобных наночастиц – носителей внеклеточного домена M2 белка

Сконструированы рекомбинантные наноразмерные вирусоподобные частицы на основе ядерного антигена вируса гепатита В, несущие на своей поверхности полипептид внеклеточного домена M2 белка вируса нового высокопатогенного штамма «свиного» гриппа A(H1N1) 2009. В результате испытаний на животных показано, что M2sHBc частицы являются высокоиммуногенными и обеспечивают защиту иммунизированных мышей от летальной инфекции вирусом «свиного» гриппа.

Acta Naturae

ТОМ 2, № 2 (5), АПРЕЛЬ-ИЮНЬ 2010

Учредители:

Федеральное агентство по науке и инновациям РФ,
Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова,
ООО «Парк-медиа»

Редакционный совет:

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

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

Редакционная коллегия:

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

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

Руководитель проекта: Е.А. Новосёлова

Выпускающий редактор: Н.Ю. Деева

Директор по стратегическому развитию:
Е.Л. Пустовалова

Подготовка иллюстраций и верстка: К.К. Опарин

Корректур: М.В. Чуланова, 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 июня 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

Государственная премия
Российской Федерации в области
науки и технологий за 2009 год 6

Кадровые ученые 7

С. Б. Сиявская

Таможенные барьеры на пути
развития биотехнологий 12

ОБЗОРЫ

С. П. Медведев, А. И. Шевченко, С. М. Закиян

Индукцированные плюрипотентные
стволовые клетки: проблемы
и перспективы применения
в заместительной клеточной терапии 18

Ю. С. Оводов

Биогликаны и природные гликозиды
как перспективные объекты
биоорганической химии 29

И. А. Михайлопуло, А. И. Мирошников

Современные тенденции
в биотехнологии нуклеозидов 38

Б. С. Шенкман, О. В. Туртикова, Т. Л. Немировская,
А. И. Григорьев

Сократительная активность скелетной
мышцы и судьба миоядер 62

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

И. Г. Халиуллин, Д. А. Суплатов, Д. Н. Шалаева,
М. Оцука, Я. Асано, В. К. Швядас

**Биоинформатический анализ
и молекулярное моделирование
участия Lys65 в каталитической триаде
D-аминопептидазы
из *Ochrobactrum anthropi* 70**

Р. Ю. Котляров, В. В. Куприянов, А. И. Мигунов,
Л. А. Степанова, Л. М. Цыбалова, О. И. Киселев,
Н. В. Равин, К. Г. Скрябин

**Разработка рекомбинантной вакцины
против гриппа А(Н1N1) 2009 на основе
вирусоподобных наночастиц — носителей
внеклеточного домена M2 белка 75**

Д. И. Марков, О. П. Николаева, Д. И. Левицкий

**Влияние «существенной» легкой цепи
A1 миозина на агрегационные
свойства миозиновой головки. 81**

В. И. Тишков, С. В. Углова, В. В. Федорчук,
С. С. Савин

**Механизм термоинактивации дрожжевой
форматдегидрогеназы при различной
ионной силе и рН среды 86**

А. Г. Коншина, И. А. Болдырев, А. В. Омельков,
Ю. Н. Уткин, Р. Г. Ефремов

**Анионные липиды как детерминанты
связывания цитотоксинов из яда змей
на поверхности клеточной мембраны 93**

Д. Риесс, И. Н. Лаврик

**Применение метода двумерного
электрофореза для изучения состава
рецепторного комплекса, образуемого
на рецепторе CD95 /Fas 102**

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

С. П. Медведев, А. А. Малахова, Е. В. Григорьева,
А. И. Шевченко, Е. В. Дементьева, И. А. Соболев,
И. Н. Лебедев, А. Г. Шилов, И. Ф. Жимулев,
С. М. Закиян

**Получение индуцированных плюрипотентных
стволовых клеток из фибробластов кожи
плода человека 108**

Правила для авторов 111

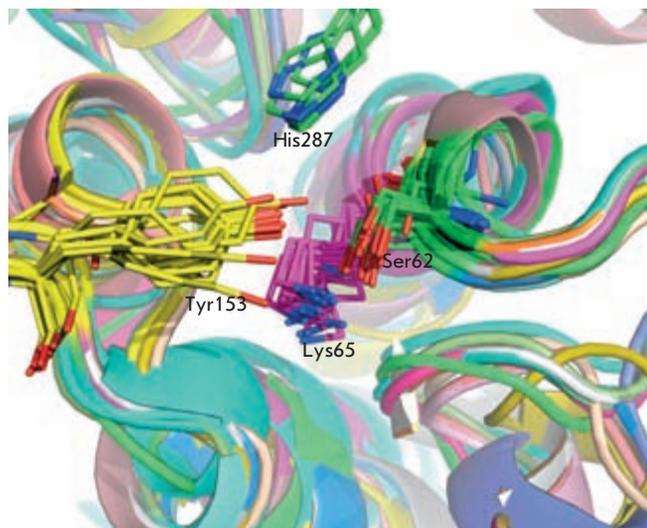


РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ

Фрагмент трехмерного выравнивания представителей семейства пенициллин-связывающих белков — структурных гомологов D-аминопептидазы из *Ochrobactrum anthropi*.

Государственная премия Российской Федерации в области науки и технологий за 2009 год

Государственная премия Российской Федерации в области науки и технологий за 2009 год за комплекс научных работ по развитию лазерно-информационных технологий в области медицины (Указ Президента РФ № 678 от 06.06.2010 г.) присуждена доктору физико-математических наук, академику РАН, директору Института проблем лазерных и информационных технологий РАН В.Я. Панченко, доктору медицинских наук, академику РАМН, заместителю директора Научно-исследовательского института нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко РАМН А.А. Потапову, доктору медицинских наук, академику РАМН, директору Московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена В.И. Чиссову.

В рамках проведенного комплекса работ впервые создана система дистанционного изготовления индивидуальных имплантатов и биомоделей по томографическим данным предоперационного обследования пациентов, передаваемых по сети Интернет в центр быстрого прототипирования и производства. Разработаны и производятся оригинальные отечественные системы быстрого прототипирования – лазерные установки стереолитографии и селективного лазерного спекания микро- и нанопорошков, биосовместимых материалов. Создаваемые на них биомодели применяются для предоперационного планирования.

Технологии предоперационного биомоделирования широко внедрены в нейрохирургию, онкологию, челюстно-лицевую, реконструктивную хирургию во многих клиниках различных регионов России и других стран. Эффект от предварительного планирования операций с использованием биомоделей проявляется в значительном сокращении времени и улучшении результатов лечения.

В области нейрохирургии решены многие проблемы лечения черепно-мозговой травмы. Впервые разработаны технические и методические приемы получения и изготовления стереолитографических моделей, полностью конгруэнтных реальным дефектам лицевого и мозгового черепа, что позволило коренным образом изменить ситуацию в пластической и реконструктивной нейрохирургии и накопить крупнейший в стране и мире клинический материал.

Разработана медицинская технология изготовления индивидуальных имплантатов из различных биосовместимых материалов и пресс-формы для их моделирования методом симме-

тричной стереолитографии и базы данных виртуальных доноров.

Впервые описана особая форма черепно-мозговой травмы – синдром длительного сдавления головы. Разрабатываются и внедряются в практику технологии компьютерного предоперационного моделирования краниocereбральных операций, технологии интраоперационной навигации, включающие трехмерные КТ-, МРТ- и УЗИ-изображения, оптическую флуоресценцию, нейрофизиологическое картирование и нейромониторинг.

Разработанная концепция и технология реконструктивной нейрохирургии, обеспечивающая восстановление структурно-функциональной целостности мозга и индивидуальной конфигурации черепа и мягких покровов головы на основе современных лазерных информационных технологий, имеют приоритетный характер.

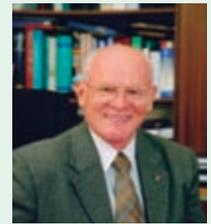
В области онкохирургии предложен подход, в котором в основу планирования операций анатомически сложных локализаций опухолей положены технологии лучевой диагностики (спиральный КТ, МРТ и 3D-УЗИ), данные которых интегрально объединяют лазерные информационные технологии, создавая реальную трехмерную модель пораженного органа. Благодаря этому доказана принципиальная возможность успешного хирургического лечения опухолей, поражающих основание черепа, черепно-челюстно-лицевую область, позвоночник, гортань и трахею. Предоперационное планирование на реальном прототипе, полученном по тех-



В.Я. Панченко



А.А. Потапов



В.И. Чиссов

нологии лазерной стереолитографии, позволяет сохранить жизненно важные структуры и повысить радикальность удаления новообразования. Впервые обнаружен факт взаимной зависимости онкологического и пластического компонентов лечения – радикальное удаление опухоли приводит к дефекту, несовместимому с жизнью, и требует немедленной, надежной реконструкции, которая невозможна без точного расчета объема и состава пластического материала с его расположением на реальной биомодели.

Разработано и создано новое поколение интеллектуальных лазерных хирургических систем. Лазерная установка в реальном времени определяет границы оперируемой области. Апробация новой установки доказала принципиальную возможность дифференцированного режима работы хирургического лазера в зависимости от различных условий. Система открывает принципиально новые возможности для проведения малотравматичных и органосохраняющих операций.

Лазерные информационные технологии внедряются и в другие разделы медицины – офтальмологию, кардиохирургию и др., путем создания специализированных под эти задачи комплексов.

В ближайшем номере журнала планируется подробная статья лауреатов Государственной премии России. ●

Кадровые ученые

В 2009 году заработала федеральная целевая программа «Научные и научно-педагогические кадры». Одно из ее мероприятий – поддержка научных исследований коллективами научно-образовательных центров (НОЦ). О вопросах, которые часто интересуют коллективы НОЦ, участвующих в конкурсах программы, мы беседуем с начальником Управления программ и проектов Роснауки Геннадием Шепелевым.

Геннадий Васильевич, как возникла идея организации в рамках ФЦП «Кадры» конкурсов для научно-образовательных центров? Чего хотели достичь? Что представляет собой образовательная составляющая проектов?

Если говорить об истории вопроса, еще в ФЦНТП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям науки и техники» 2005–2006 гг. проводились мероприятия по созданию НОЦ. По результатам этих работ стало понятно, что проблема подготовки научных кадров является самостоятельной большой проблемой, и федеральная целевая программа «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» возникла в качестве одного из инструментов решения этой проблемы.

Научно-образовательные центры – это часть системы подготовки научных кадров, один из инструментов, который позволяет объединить научные исследования и образовательную деятельность. Одна из задач НОЦ состоит в том, чтобы привлечь ученых к подготовке молодых специалистов. В НОЦ подготовка молодых специалистов осуществляется на практике через привлечение их к научным исследованиям. Это позволяет подкрепить теоретическую подготовку практическими навыками, полученными при проведении экспериментальных исследований.

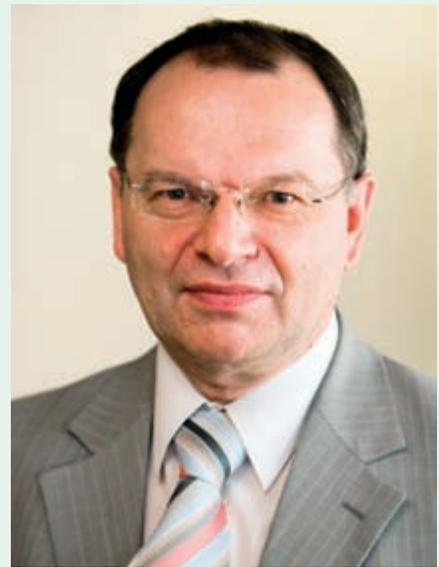
В свою очередь, образовательная составляющая деятельности НОЦ ориентирована на то, чтобы новые знания, полученные в рамках проводимых исследований, использовались в образовательном процессе – в учебных курсах, лекциях, практикумах, семинарах.

Очевидно, что современное образование должно базироваться не только на классических, но и новых данных. Один только пример: об образовании в IT-индустрии постоянно идут дискуссии – в учебниках и в учебных программах остается немало архаичных вещей. Это вряд ли стимулирует студентов к занятиям наукой в этой области, потому что сплошь и рядом в своей жизни молодые люди сталкиваются с новыми разработками и технологиями, которые не отражены в курсах, которые они слушают в вузе. Устаревшие учебники создают искаженное восприятие об уровне научных исследований в этой области. НОЦ призваны решать в том числе и эти проблемы.

В 2010 году запущена новая волна проектов. Отличается ли уровень заявок от того, что было в прошлом году? Вопрос связан, в частности, с тем, что в прошлом году профинансировано большее число проектов, чем планировалось, – не исчерпались ли хорошие проекты?

В прошлом году программой была предусмотрена поддержка 450 проектов, объемом до 15 миллионов рублей на три года. В связи с тем, что бюджет ФЦП «Кадры» был уменьшен на 15 %, средств хватало на 383 проекта. Однако из-за того, что средняя цена контракта в результате конкурсов получилась меньше, реально было подписано 502 контракта.

Несмотря на то что было поддержано больше заявок, чем планировалось, нет признаков того, что исчерпались хорошие проекты. В этом году число заявок на конкурс увеличилось. По первым восьми очередям конкурсов – уже подано более 2800 заявок, а всего до конца года мы ожидаем бо-



Геннадий Шепелев

лее 5000. При этом следует, конечно, отметить, что среди заявок есть и повторы – то есть проигравшие в одной очереди заявки участвуют в конкурсе по следующим очередям. Таким образом, число уникальных заявок будет меньше, чем общее число из-за таких повторов.

Насколько сильно снизилась средняя цена контракта по сравнению с исходной? Как это могло повлиять на качество работ и на распределение победителей в конкурсах?

Есть мнение, что снижение цены – это негативный фактор, но при этом следует учесть, что увеличилось число участников программы, больше научных групп получили финансирование – а это факт скорее положительный.

По поводу цены можно сказать следующее. Исходная цена контракта, выставляемого на конкурс, – это 15 миллионов рублей, или примерно 500 тысяч долларов США. По прошлому году средняя стоимость заключенных контрактов составила 11.4 миллиона рублей, в этом году по первым очередям – пока составляет 8.6 миллиона рублей. Для сравнения, средний объем грантов американского фонда NSF (National Science Foundation) составляет около 300–350 тысяч долларов США на три года. Это примерно тот уровень цены, на который мы в итоге сейчас вышли по нашей программе. При этом надо еще учитывать разницу средних зарплат у нас и в США. Так что стоимость контрактов вполне соответствует мировым стандартам.

Естественно, что отдельные заявки опускались ниже по цене, но при этом другие были выше. Нет какой-то единой «правильной» стоимости проекта. Для одних проектов нужны более дорогие материалы, для других – более дешевые. Кроме того, цена контракта должна соотноситься и с результатами, которые в нем будут получены. Здесь потенциально возможны две ошибки: когда за работу переплачивают или когда за нее дают слишком мало, из-за того что конкуренты в рамках одного конкурса сбивают цену. Как известно, закон о госзакупках 94-ФЗ запрещает заказчику требовать смету проекта. Так что в данном случае мы ограничены в возможностях получения такой информации еще и законодательством.

Что касается того, насколько сильно победа в конкурсе зависит от снижения цен и сроков, то в РИЭПП проанализировали, как поменялся бы состав победителей 2009 года, если бы не учитывались цена контракта и срок его исполнения (сейчас, кстати, от сроков как фактора, влияющего на результат конкурса, решили отказаться, так как для получения серьезного выигрыша в баллах, теперь срок требуется уменьшить на 25 %, и это явно будет в ущерб работе. Вследствие этого роль цены теперь возрастет еще сильнее). Выяснилось, что состав победителей изменился бы всего примерно на 15 %. Много это или мало – можно спорить. Но, например, разброс в оценках одного и того же проекта

разными экспертами может составлять примерно такую же величину. Иными словами, есть и другие, помимо цены и сроков работ, факторы, имеющие ту же значимость, дающие примерно тот же разброс в конечных результатах оценки.

Но все-таки, есть ли способ избежать победы в конкурсе совсем плохих, демпингующих заявок?

Опять в вопросе заложено предположение, что демпингующие заявки – плохие. Цена и качество – это разные показатели при оценке заявки. Плохие заявки мы стараемся не пропускать, и есть определенный механизм как это можно сделать. Например, у каждого проекта есть индикаторы по привлечению в него молодежи, и чтобы по ним отчитаться, необходимо заплатить зарплату соответствующему числу сотрудников. Так вот, исходя из минимума этой оплаты труда, получается: чтобы индикаторы проекта были выполнены, его цена должна быть 7–9 миллионов рублей. Если она опускается ниже, мы знаем, что индикаторы будут провалены, а значит, проект не соответствует условиям конкурса и поддержан не будет. Мы стараемся сделать так, чтобы критерий качества был преобладающим, но и от критерия стоимости отказаться не можем; 94-ФЗ – это закон, его нарушение карается административным наказанием.

Здесь есть еще один момент – число специалистов, которые при этом привлекаются в проект, вполне может быть завышенным, то есть, по сути, для выполнения исследования необходимо число людей меньше заявленного. Это был бы, несомненно, негативный фактор, если бы мы рассматривали только вопрос экономии средств. Но одна из наших задач – это привлечение молодежи к научным исследованиям, то есть здесь мы отчасти сами толкаем научные группы на завышение цены работ за счет привлечения менее квалифицированных исполнителей. Кроме того, надо понимать, что очень часто коллективы не работают строго в рамках задания по контракту – специфика научной работы такова, что ее очень часто ведут в более широких рамках, чем записано в техническом задании на работу; соответственно на это будут уходить средства из бюджета проек-

та и силы занятых в нем сотрудников. Это можно было бы рассматривать как нецелевое использование средств, но в общей логике научной работы такая ситуация – правильная. Научные коллективы в поисковых работах должны иметь более широкие рамки для своей деятельности.

Один из индикаторов проектов НОЦ – это привлеченные молодые сотрудники. Во время проекта они работают в организации, а после него? Предполагается ли какой-то механизм их закрепления и после окончания проекта?

В мировой практике нет проектов, в которых люди получали бы пожизненную гарантию на финансирование. Для закрепления научных кадров в научных организациях есть штатные единицы, и их число ограничено, но есть и ставки по хозяйственным работам. Чтобы они сохранялись после завершения проекта, необходимо работать по получению новых грантов и контрактов. Очень большой ресурс здесь – это сотрудничество с бизнесом. В нашей стране примерно 65 % исследований финансируются бюджетом и только 35% – это внебюджетное финансирование. За рубежом это соотношение выполняется с точностью до наоборот. Но и в России есть примеры, когда вуз порядка 50 % получает от работы на заказ от бизнеса. Сейчас давление на бизнес со стороны государства в этом вопросе растет, особенно на компании с государственным участием – они должны будут выделять некоторый процент от своего оборота на науку. Кроме того, недавно было принято 218-е постановление Правительства о поддержке кооперации вузов и производственных компаний – это также ресурс, откуда можно будет брать дополнительное финансирование научных коллективов.

Но ведь организации могут привлекать молодых сотрудников, вообще не предполагая их закрепления – просто под финансирование НОЦ – и избавиться от них, как только оно закончится...

Конечно, некоторые организации могут пойти и по такому пути – избавиться от кадров, когда проект закончится. Но административно регулировать эти отношения – значит выходить за рамки проектов, которые поддерживаются ФЦП. Проекты, выделяемые

в рамках программы для НОЦ, – это возможность проверить в деле молодых сотрудников, но не административное решение их навсегда закрепить в составе НОЦ. Реальное число молодых людей, занятых в проектах, всегда будет больше, чем может трудоустроить выполняющая проект организация – иначе следовало бы убрать из названия центров слово «образовательный». Часть из них действительно может уйти, но абстрактно нельзя сказать, что это хорошо или это плохо. Предполагается, что участники работы по проекту получили более высокую квалификацию и где-то (не обязательно в НОЦе) будут применять полученные знания и навыки. Если экономика получила более квалифицированных специалистов, то польза от этого может быть не только в том случае, если они остались работать в подготовившей их организации.

Бывает, научный коллектив отчитывается по проекту статьей, поданной в журнал еще до старта проекта. Как это можно оценить?

Снова здесь нет «черно-белого» ответа. Если НОЦ существует не для отчета, а по существу, то у него должны быть заделы в научных разработках, созданные до заключения контракта, – это в том числе учитывается при определении лучших НОЦ. С этой точки зрения не так важно, когда была задумана статья. Придерживать статьи, чтобы подать их в журналы в рамках выполнения проекта – это все-таки нонсенс. Другое дело, если

в процессе выполнения работы не возникло других статей, – но это уже предмет для контроля хода выполнения проекта.

Что можно сказать про общую ситуацию с текучестью научных кадров в России?

Серьезных исследований процессов, происходящих в кадровой сфере науки, к сожалению, нет – есть только общая статистика без детализации. Отсюда возникает много спекуляций – и пессимистических предположений, и интерпретаций ситуации с различными оттенками в зависимости от позиции того, кто эти оценки делает.

В качестве иллюстрации можно привести такой пример. За последние годы самый серьезный отток кадров из науки наблюдался во вполне еще благополучном 2008 – снижение по численности научных сотрудников составило около 5 %, хотя перед этим в 2007 году был абсолютный рост числа сотрудников в сфере науки. Сокращение прошло примерно равномерно по всем организациям – как государственным, так и не государственным. При этом доля научных сотрудников среди всего персонала, занятого исследованиями и разработками, повысилась. Возможно, люди уходили в бизнес, где в это время был значительный рост доходов, возможно, какую-то роль сыграли сокращения по результатам ухудшения экономической ситуации в конце года – более подробной информации о происходивших процессах нет.

Но, как я уже говорил, этот факт нельзя трактовать однозначно в терминах «хорошо или плохо» – везде можно найти разные стороны проблемы. Здесь надо бы задаться вопросом – сколько реально надо людей для научных исследований? Что мы от них хотим получить? Только статьи? Однозначно нет. Одним из следствий такого ухода людей из научного сектора может быть и повышение конкурентоспособности производства – в промышленности нужны не только технологии, но и грамотные специалисты.

Приведу один пример. В Советском Союзе я работал в институте, который среди прочего занимался разработкой лазерных кристаллов. Когда технология изготовления кристаллов передавалась из НИИ, где проходила разработка, на серийный завод, показатели кристаллов заметно ухудшались. Почему так происходило? Одно из предположений – тот самый человеческий фактор, меньшая квалификация заводского персонала по сравнению с персоналом научной организации.

Что ждет НОЦ в этом и следующем году?

В этом году в дополнение к объявленным ожидается еще порядка 300 с небольшим контрактов для НОЦ. Что будет в следующем году, станет ясно после утверждения бюджета программы. Мы надеемся, что речь пойдет не менее чем о 500 контрактах. ●

Беседовал Иван Охупкин

Как с «Кадрами» в Life Sciences?

Направление «Живые системы» занимает приоритетное место в ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры», что демонстрируется статистикой по мероприятию «Проведение научных исследований коллективами научно-образовательных центров» (табл. 1)

Общий конкурс по итогам 2009 г. составил 5.1 заявки на один лот. Для сравнения: в 2009 г. средний кон-

курс по направлению «нанотехнологии и наноматериалы» составил восемь заявок на лот.

При этом, судя по прошедшим очередям отбора по направлению «Живые системы» в 2010 г., конкурс по сравнению с 2009 г. вырос, хотя средняя цена контракта в 2010 г. заметно снизилась (вероятно, из-за несовершенства законодательства о госзакупках). Увеличение конкурса связано с ростом количества демпин-

говых заявок, использующих недочеты 94-ФЗ о госзакупках, и приводит к «размазыванию» госсредств по более мелким лотам. Фактически, средний размер контракта 2010 г. в полтора-два раза ниже, чем было запланировано авторами ФЦП при ее разработке.

В табл. 2 показано распределение заявок и контрактов по тематикам внутри направления «Живые системы».

Таблица 1.

Наименование показателя	Мероприятие 1.1	
	2009	2010*
Количество заявок (Life Sciences)	421	333
Количество поддержанных проектов НОЦ (Life Sciences)	82	43
Общая сумма поддержки, млн руб.	986.0	377.9
в т.ч. в 2009 г.	312.6	–
в т.ч. в 2010 г.	353.0	126.0
Средняя цена контракта, млн руб.	12.0	8.8
в т.ч. в 2009 г.	3.8	–
в т.ч. в 2010 г.	4.3	2.9
Максимальная цена контракта, млн руб.	15.0	12.5
в т.ч. в 2009 г.	5.0	–
в т.ч. в 2010 г.	5.0	4.2
Минимальная цена контракта, млн руб.	6.0	4.5
в т.ч. в 2009 г.	0.5	–
в т.ч. в 2010 г.	2.0	1.5

*Конкурсы в 2010 г. еще продолжаются.

Таблица 2.

Тематические группы	Конкурс		Число проектов		Число заявок	
	2009	2010	2009	2010	2009	2010
141 Общая биология и генетика	2.4	7.8	12	4	29	31
142 Физико-химическая биология	2.6	6.2	12	5	31	31
143 Фундаментальная медицина	4.9	5.5	19	14	94	77
201 Биокаталитические технологии	4.5	11.5	4	2	18	23
202 Биомедицинские технологии защиты	9.0	9.3	20	14	179	130
203 Геномные технологии	5.0	10.3	3	4	15	41
204 Клеточные технологии	5.0		3	–	15	–
205 Биоинженерия	3.3		4	–	13	–
206 Биоинформационные технологии	7.0		2	–	14	–
209 Создание биосовместимых материалов	4.3		3	–	13	–
Среднее / всего	5.1	7.7	82	43	421	333

Интересны данные по ведомственной принадлежности организаций-победителей (табл. 3). Если бы не издержки закона о госзакупках, их можно было бы считать отражающими реальное распределение сильных центров Life Sciences по российским ведомствам. Увы, сейчас эти данные не столь информативны.

Примечательно, что МГУ, выигравший в 2009 г. семь конкурсов на поддержку НОЦ, в 2010 пока выиграл всего один. Тем не менее университет

остаётся явным лидером по числу НОЦ среди всех организаций.

Табл. 4 демонстрирует 15 самых активных участников конкурсов проектов НОЦ по живым системам 2009–2010 гг.

Как видим, из 15 организаций, подавших 8 и более заявок, 11 – вузы. При этом шансы на победу (т.е. некое отражение научного уровня и качества проекта) у НИИ отделения биологических наук РАН были несколько выше, чем у университетов, НИИ

других отделений РАН и прочих ведомств. Так, ИМБ РАН и ИБГ РАН выиграли по два лота при трех поданных заявках от каждого института. Впрочем, такие же (2 контракта при 3 заявках) результаты у ряда других признанных биологических центров: Пушкинского госуниверситета, НИИ ФХМ и др.

В завершение укажем лидеров по объему финансирования госконтрактов по прошедшим конкурсам 2010 г. (табл. 5). ●

Таблица 3.

Вузы Рособразования	42
РАН	38
РАМН	18
Вузы Минздрава и учреждения его агентств	16
МГУ им. Ломоносова	8
РАСХН	1
Минсельхоз	1
Прочее (ФГУП НИФХИ им. Карпова)	1
Всего	125
<i>Примечание:</i> указано число контрактов на поддержку НОЦ, а не число организаций-победителей.	

Таблица 4.

Организация	Число заявок	Число контрактов
ГОУ ВПО Новосибирский государственный университет	11	3
ФГОУ ВПО Южный федеральный университет	10	1
ФГОУ ВПО Российский государственный университет имени Иммануила Канта	10	1
Учреждение РАН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН	9	2
ГОУ ВПО Российский университет Дружбы народов	9	2
ГОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию	9	3
ГОУ ВПО Томский государственный университет	9	1
ГОУ ВПО Санкт-Петербургский государственный политехнический университет	8	0
ФГОУ ВПО Санкт-Петербургский государственный университет	8	2
Учреждение РАМН НИИ кардиологии Сибирского отделения РАМН	8	1
Учреждение РАН Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН	8	3
ФГОУ ВПО Национальный исследовательский ядерный университет (МИФИ)	8	1
ГУНУ Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова	8	1
Учреждение РАН Институт молекулярной генетики РАН	8	3
ГОУ ВПО Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского	8	2

Таблица 5.

Организация	Тема	Сумма контракта, млн руб.
ФГУ НИИ физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства	Изучение паракринных механизмов действия мезенхимальных стволовых клеток на регенерацию тканей с помощью протеомного анализа	12.5
ФГУ НИИ урологии Федерального агентства по высокотехнологической медицинской помощи	Разработка комплексной диагностической измерительной системы для исследований функциональной активности верхних и нижних мочевых путей	12.0
ГОУ ВПО Московский энергетический институт (технический университет)	Исследование состояния и эволюционного изменения биологических объектов методами лазерной дистанционной диагностики	11.0
ФГОУ ВПО Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина	Разработка инновационных диагностических методик в области физиологии и биохимии животных как модельных объектов для медицины	10.8
ГУНУ Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова	Разработка метода молекулярного мониторинга распространения вирусных инфекций и определения активности противовирусных соединений с целью создания терапевтических препаратов нового поколения	10.8

Подготовил Иван Стерлигов по материалам Национального фонда подготовки кадров (НФПК) – Аналитической дирекции ФЦП. Редакция благодарит Александра Клягина (НФПК).

Таможенные барьеры на пути развития биотехнологий

С. Б. Синявская, специально для Acta Naturae

Научные исследования в области живых систем невозможны без международной кооперации, а значит, не обойтись без заграничного оборудования, реактивов, лабораторных животных, биологического материала. Однако таможенное регулирование в сфере биотехнологий вызывает у ученых много вопросов, прохождение таможенного контроля отнимает массу времени, сил и денег. Можно ли упростить бюрократические процедуры при международных перевозках товаров для научно-исследовательских работ?

XXI век – век биотехнологий; они лежат в основе шестого технологического уклада. Значимость этой области знания для развития современного общества осознают и в правительстве: *технологии живых систем* были утверждены среди приоритетных направлений развития науки и техники в 2002 и 2006 годах; президентская комиссия по модернизации утвердила *медицинские технологии* в качестве одного из пяти приоритетных направлений инновационного развития экономики; в ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы» направление «Живые системы» занимает одно из ведущих мест – на исследования в этой области выделяется более 30 % от общего финансирования программы.

Очевидно, что государство, выделяя данную область знаний среди других, должно стремиться создать для нее такие условия работы, при которых бы оптимально расходовались деньги научных организаций и время их сотрудников: в противном случае ждать соответствующей финансовым вложениям отдачи от этой отрасли невозможно.

Однако как раз с условиями работы у российских ученых, работающих в области живых систем, и возникают проблемы. Одна из наболевших – та-

моженные барьеры, препятствующие интеграции российской науки в систему мировых научных и хозяйственных связей. По замечанию члена-корреспондента РАН **Александра Габибова**, построен искусственный железный занавес – редкая международная посылка законным способом, в разумные сроки и за разумные деньги может пройти таможенный контроль.

Так, если вы обращаетесь к **компаниям**, занимающейся поставкой оборудования, реактивов и прочее, то стоимость товара – а зачастую это дорогостоящие материалы – возрастает примерно в 2.5–3 раза, зато и груз подготовки к таможенной процедуре снимается с плеч научной организации. Разумеется, по этому пути идут редко: на закупку оборудования и реактивов и без того уходит от 10 до 50 % грантовых средств. Как правило, ученые проходят таможенный контроль самостоятельно или прибегают к услугам **компаний-перевозчика**. В последнем случае необходимо не только оплатить услуги перевозчика и таможенные платежи, но и собрать пакет документов, необходимых для прохождения таможенного контроля. Например, если рассматривать доставку компанией DHL, необходимо следующее:

- письмо с просьбой о выпуске груза;
- перевод инвойса на русский язык;
- подробное описание товара;

- копия соглашения о бесплатной передаче между отправителем и получателем;
- регистрация на Шереметьевской либо Московской таможне (может быть выполнена силами DHL на основании предоставленных документов);
- разрешительные документы, список которых зависит от конкретного кода товара, который подбирается на основе подробного описания (разрешение Минздравсоцразвития, ветеринарный сертификат, иные в зависимости от описания).

Для ввоза биологического материала для научных исследований необходимы разрешения Минздравсоцразвития и Госнарконтроля, получение которых довольно трудоемко и длительно (списки представляемых документов приведены в Приложениях 1, 2).

Размер таможенных платежей рассчитывается следующим образом:

- ввозная таможенная пошлина составляет 0–20% (в зависимости от кода товара) от суммы таможенной стоимости (таможенная стоимость – это стоимость груза по инвойсу + стоимость доставки);
- НДС в размере 18% суммы таможенной стоимости + таможенной пошлины;
- минимальный таможенный сбор для юридического лица составляет 500 рублей;

Сенотрсова Светлана Валентиновна, доктор биологических наук, профессор кафедры организации таможенного контроля Российской таможенной академии



Насколько, на Ваш взгляд, оправдан столь затрудненный ввоз веществ, необходимых для научных исследований?

– Считаю, что существующие особенности таможенного контроля химических реактивов в какой-то мере оправданы, поскольку это особая группа товаров, весьма ядовитых. Разделить ввоз товаров для научных или других мероприятий не всегда представляется возможным, поскольку таким ввозом занимаются посреднические фирмы.

Представители научной общественности уже давно заявляют о необходимости присвоения товарам, используемым исключительно в научных или исследовательских целях, одного кода (3822 00 000 0), как это практикуется в Европе и США. Почему в России до сих пор не перейдут на единый код для данной группы товаров?

– В группу 3822 00 000 0 входят реагенты диагностические или лабораторные на подложке, готовые диагностические или лабораторные реагенты на подложке или без нее, кроме товаров товарной позиции 3002 или 3006; сертифицированные эталонные материалы. Действительно, по этой товарной позиции нет запрета на ввоз. Но она также отягощена рядом сопроводительных документов. Но две такие большие группы, которые включают в себя продукты, соединения неорганической и органической химии, редкоземельные металлы, радиоактивные элементы, их изотопы, объединить в одну товарную позицию с кодом 3822 не представляется возможным с точки зрения безопасности государства. Подавляющее большинство из этих веществ и соединений требует применения мер нетарифного регулирования. Необходима глубокая диверсификация внутри товарных групп 28, 29, 38 ТН ВЭД ЕТТС.

В номенклатуре отсутствуют многие позиции биоматериала, используемого в научной работе. Вот конкрет-

ный пример — экспресс-почтой TNT в лабораторию была выслана из римского университета La Sapienza плаزمида со всеми сопроводительными документами, но таможенники не смогли найти соответствующий код, и посылка вернулась в Рим.

– Действительно, в номенклатуре отсутствуют некоторые позиции биоматериала, используемого в научной работе, но это и не новость, поскольку наука развивается гораздо быстрее, чем вносятся изменения в ТН ВЭД. Для декларирования таких товаров необходим грамотный подход, в первую очередь, со стороны участника ВЭД, специалиста по таможенному оформлению или брокера. К сожалению, у нас ведется недостаточная подготовка специалистов по таможенному оформлению особых групп товаров! Именно декларант имеет преимущественное право перед таможенным органом на определение кода товара и начисление таможенных пошлин, а таможенному органу принадлежит контролирующая роль. В случае с возвратом плазмиды, в первую очередь, есть недоработка декларанта и таможенного брокера. Подобные ситуации возникают не так часто.

Какие изменения должны быть сделаны в законодательстве, чтобы упростить таможенное регулирование в научно-исследовательской сфере?

– Считаю актуальным вопрос оптимизации таможенных пошлин, касающихся реактивов, предназначенных для научно-исследовательских целей, поскольку это не повлияет на выполнение фискальной функции таможенного тарифа ТС, но будет способствовать развитию научных исследований в России. Другим вопросом оптимизации ввоза может быть сокращение круга импортеров такой продукции, однако об освобождении или упрощении здесь таможенного контроля речь не идет.

Существует первоочередной порядок оформления товаров, подвергающихся быстрой порче, живых животных и так далее (ст. 67 ТК РФ), и им нужно умело пользоваться. Для внесения изменений в законодательство с целью упрощения перемещения товаров для научно-исследовательских целей необходимы очень серьезные детальные обоснования, которые требуют серьезных временных затрат. Этим вопросом мы занимаемся, но он достаточно сложный.

– минимальная стоимость брокерских услуг составляет 7 000 рублей (без НДС, стандартный тариф, если груз следует по сети DHL Express с доставкой до двери получателя) и зависит от необходимости дополнительных услуг.

Можно оформить груз **самостоятельно**, при этом надо учесть, что в таможенной службе консультаций по телефону не дают. Чтобы понять, какой полный пакет документов следует подготовить, необходимо прийти на прием, предварительно определив десятизначный код (что довольно трудно сделать самому). Вот еще не-

которые сложности, ожидающие декларанта на пути самостоятельного прохождения таможенного контроля:

– Наибольшие проволочки связаны с получением так называемых «отказных писем» от пяти ведомств: Минздравсоцразвития, Минсельхоза, Госнарконтроля, Ростехнадзора и Федеральной службы по техническому и экспортному контролю. Письма должны указывать, к классу лекарственных или ветеринарных препаратов, наркотических и сильнодействующих веществ, опасных отходов и товаров двойного применения, а так-

же не подлежит сертификации и лицензированию. Процесс получения такого рода разрешительной документации может затягиваться до двух-трех месяцев.

– Затрудненное таможенное декларирование.

– На данный момент из-за непродуманного набора таможенных кодов легально провезти в нашу страну очень сложно как животных, так и биоматериал – клеточные линии, ДНК (например, плазмиды) и бактерии. В номенклатуре отсутствуют многие позиции биоматериала, используемого в научной работе.

Габибов Александр Габибович, руководитель лаборатории биокатализа Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, член-корреспондент РАН, доктор химических наук, профессор



– В советские годы реактивы из-за границы мы заказывали где-то за год, сейчас некоторые реактивы мы получаем больше года, к тому же, пройдя таможенный контроль, они становятся намного дороже, чем для западных пользователей. О каких предпочтениях, о каком развитии рынка или исследованиях в нанобиотехнологиях можно говорить, если порой до 50 % грантовых денег мы тратим на закупку оборудования? О каких исследованиях, соответствующих мировому уровню, может идти речь, если ни животных, ни производных продуктов (человеческую или животную кровь) невозможно провезти законным образом? Например, нам в филиал ИБХ в г. Пущино необходимо поставлять линейных мышей, однако провезти их мы можем лишь как подарок. Правда, за такой «подарок» тоже приходится платить большие суммы транспортным компаниям и таможенным структурам. Поэтому нам легче проводить опыты с животными в израильском и французском филиалах, то есть административные

препоны настолько ужасны, что, несмотря на то что технология исследований у нас есть, мы вынуждены переводить ее на Запад. Кстати, западные исследователи могут перевозить кровь животных, а нам для этого необходимо получить разрешение, в котором бы говорилось, что кровь эта не содержит наркотических веществ. Но ведь возем-то мы эту кровь в субмикронных дозах, поэтому даже если бы там были наркотики, их нельзя экстрагировать просто по количеству вещества. Нельзя нас лишать работы только потому, что чиновникам проще запретить. Например, для исследования электропотенциалов клеток нам необходимы токсины паука. Западный ученый их может купить, подписав ряд бумаг о том, что он обязуется их использовать для таких-то целей. А российский ученый не может это провезти через границу. К тому же мы не можем получить быстропортящиеся препараты, которые такие компании, как Fedex, DHL, во все страны доставляют в сухом льду: таможенный контроль займет столько времени, что на российской границе все растает.

Для того чтобы открыть этот железный занавес, необходимо разработать ряд нормативных документов, научное сообщество готово активно участвовать в их разработке. Полагаю, что в таможне – где сейчас работают квалифицированные специалисты – необходимо создать службу «одного окна», да и ветеринарные службы должны находиться внутри таможни, а не за тридевять земель.

– Таможенные пошлины не различают вещества, присланные для проведения научных исследований или на продажу. Из-за этого ученым приходится подготавливать массу документов, подтверждающих их «благие намерения».

Для получения одного только разрешения от Минздравсоцразвития, которое действительно 30 дней, необходимо подготовить довольно большой пакет документов (подробнее см. Приложение 1), включающий в себя разрешение Постоянного комитета по контролю наркотиков на вывоз (ввоз) биологических объектов (список документов для подачи на рассмотрение представлен в Приложении 2).

– Кроме того, следует учесть, что некоторые виды биологического материала могут быть испорчены из-за несоблюдения условий перевозки и хранения на таможенном складе (например, для транспортировки клеточных линий необходим определенный температурный режим: сухой лед -80°C).

Как видим, для того чтобы получить материал для научного исследо-

вания, нужен не один месяц, много сил и немало денег.

Побывать по другую сторону баррикад, то есть попытаться пройти таможенный контроль самостоятельно, нам так и не удалось: на момент подписания номера в печать не нашлось ни одного брокера или компании, согласившихся поработать в сопровождении журналистов (несмотря на предварительную договоренность). Не нашлось ответа на наши вопросы и в Федеральной таможенной службе: сославшись на занятость в связи с подписанием таможенного соглашения между Россией и Казахстаном, от комментариев там отказались. Словом, попытка написать объективный материал о таможенном контроле биологических веществ чем-то напомнила рассказы ученых о том, как они этот контроль проходят.

И все же альтернативное мнение найти удалось. По словам кандидата юридических наук адвоката **Сергея Жорина**, многих проблем в таможенном оформлении можно избежать, «если не откладывать на последний момент реализацию необходимых действий»: «Научные исследования

обычно проводятся в плановом режиме, поэтому а) предполагая, какие именно вещества понадобятся в ближайшие 3–6 месяцев, надо обратиться в таможенный орган за консультацией с целью получения информации о разрешительных документах, которые нужно будет представить при таможенном оформлении; б) в спокойном режиме получить необходимые документы; в) произвести предварительное декларирование, т.е. таможенная декларация на товары подается до их фактического ввоза товара на территорию РФ; г) затем сообщить отправителю о готовности принять заказанные ранее товары. В данном случае выполнение таможенных формальностей не займет большого количества времени».

Что же касается присвоения товарам, используемым исключительно в научно-исследовательских целях, одного кода (3822 00 000 0), как это практикуется в Европе и США, то, по словам Сергея Жорина, вопрос «внесения товаров в ту или иную товарную позицию товарной номенклатуры (ТН) относится исключительно к компетенции Правительства РФ.

В рамках проводимой в настоящее время Концепции развития таможенных органов РФ целесообразно создание специализированного таможенного поста (либо отдела таможенного оформления), на котором таможенное оформление таких товаров происходило бы в кратчайшие сроки».

По мнению таможенного брокера **Андрея Кириенкова**, государство вряд ли пойдет на присвоение единого кода данной группе товаров, поскольку разные товары облагаются

разными пошлинами, в западных же странах «контролирующие органы гораздо больше работают по целевому использованию, чем наши». Главная же проблема в том, что научные предприятия вообще не имеют никаких преференций перед другими: «Надо сначала преференции получить, а потом уже “пробивать” какие-то иные вещи. В ФТС, например, есть методика выдачи льгот и разрешений, научным институтам необходимо объединиться в вопросах лоббирования своих интересов и решить этот вопрос

самостоятельно, а не надеяться на государство».

Правда, в таком случае и правительству сложно питать надежду на отдачу от вложенных средств в развитие биотехнологической отрасли.

Благодарим ООО «Управляющая компания “Биопроцесс Капитал Партнерс”» и лично Ольгу Голуб за предоставленный аналитический материал и Приложения. ●

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ПИСЬМО
от 17 октября 2000 г. № 2510/11197-32

О ВВЕДЕНИИ В ДЕЙСТВИЕ ВРЕМЕННОГО ПОРЯДКА ПО ВВОЗУ (ВЫВОЗУ) БИООБЪЕКТОВ

Направляется для руководства и исполнения Временный порядок рассмотрения документов, представляемых организациями (учреждениями) в Министерство здравоохранения Российской Федерации, для оформления разрешения на ввоз в Российскую Федерацию и вывоз за рубеж биологических объектов в рамках международного научного сотрудничества, утвержденный 12 октября 2000 г. во исполнение Приказа Министерства здравоохранения Российской Федерации от 14 июля 2000 г. № 259.

Указанный Временный порядок призван регламентировать проведение в Российской Федерации на единой организационно-методической основе оформление ввоза (вывоза) биологических объектов, осуществляемых по линии международного сотрудничества в различных областях медицинской науки.

Первый заместитель
Министра здравоохранения
Российской Федерации
А.И. ВЯЛКОВ

Утверждаю
Первый заместитель
Министра здравоохранения
Российской Федерации
А.И. ВЯЛКОВ
12 октября 2000 года

ВРЕМЕННЫЙ ПОРЯДОК РАССМОТРЕНИЯ ДОКУМЕНТОВ, ПРЕДСТАВЛЯЕМЫХ ОРГАНИЗАЦИЯМИ (УЧРЕЖДЕНИЯМИ) В МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ, ДЛЯ ОФОРМЛЕНИЯ РАЗРЕШЕНИЯ НА ВВОЗ В РОССИЙСКУЮ ФЕДЕРАЦИЮ И ВЫВОЗ ЗА РУБЕЖ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ В РАМКАХ МЕЖДУНАРОДНОГО НАУЧНОГО СОТРУДНИЧЕСТВА

Настоящий Временный порядок устанавливается во исполнение Приказа Минздрава России от 14.07.2000 № 259 (п. 1.7) в целях упорядочения оформления разрешений организациям (учреждениям) на ввоз в Российскую Федерацию и вывоз за рубеж биологических объектов в рамках проводимого международного научного сотрудничества.

I. Общие положения по оформлению документов организацией (учреждением) для ввоза (вывоза) биологических объектов

1. Организация (учреждение) направляет на имя руководства Минздрава России ходатайство по прилагаемой форме с пакетом документов согласно разделу II настоящего Временного порядка.

2. Представляются первые экземпляры документов или в отдельных случаях их копии, которые заверяются нотариально. Документы, имеющие более 1 листа, прошиваются. Незаверенные и недописанные документы к рассмотрению не принимаются.

3. Документы (договора, контракты, соглашения и т.п.) должны иметь подписи с их расшифровкой и четкие печати сторон.

4. Документы представляются на русском языке. При наличии документа на иностранном языке прилагается его перевод, заверенный руководителем организации (учреждения) в установленном порядке, с указанием лица, сделавшего перевод.

5. Разрешение на вывоз биологических объектов выдается только российским организациям (учреждениям), имеющим право осуществления научной и (или) научно-технической деятельности с иностранными юридическими лицами.

6. Разрешение Минздрава России является разовым документом и оформляется во всех случаях вывоза (ввоза) биологических объектов по научному международному сотрудничеству и выдается в адрес обратившейся организации (учреждения).

7. Разрешение на ввоз (вывоз) биологических объектов выдается организации (учреждению) в одном экземпляре и не подлежит передаче другим организациям (учреждениям).

8. Разрешение на ввоз (вывоз) биологических объектов действительно в течение 30 дней со дня даты, установленной регистрационным номером Минздрава России.

9. Оригинал разрешения Минздрава России представляется организацией (учреждением) в таможенный орган Российской Федерации по месту регистрации в соответствии с порядком, установленным Государственным таможенным комитетом Российской Федерации.

10. При изменении юридического статуса организации (учреждения), изменений в договоре (соглашении, контракте) сторон требуется новое представление полного пакета документов.

11. Лицо, подписавшее документы, несет ответственность за достоверность сведений и данных, представленных в Минздрав России для получения разрешения на вывоз (ввоз) биологических объектов в рамках научного международного сотрудничества, в соответствии с законодательством Российской Федерации.

12. Минздрав России может отказать организации (учреждению) в выдаче разрешения на ввоз (вывоз) биологических объектов по следующим причинам:

12.1. Неправильное оформление пакета документов организации (учреждения).

12.2. Представление материалов не в полном объеме, а также несоблюдение требований, предусмотренных настоящим Временным порядком.

12.3. Наличие в документах недостоверной или искаженной информации.

II. Пакет представляемых документов организацией (учреждением) на ввоз (вывоз) биологических объектов

1. Ходатайство организации (учреждения) по прилагаемой форме.

2. Договор [контракт, соглашение, грант (дать расшифровку гранта и основные его положения)] о международном научном сотрудничестве.

При проведении совместных научных исследований по межправительственным соглашениям представляется копия этого документа либо выписка из него, заверенная в установленном порядке.

3. Учредительные и регистрационные документы организации (учреждения)-заявителя.

4. Копии лицензии на право занятия научной деятельностью в области медицины и биологии всех участников договора (соглашения, контракта).

5. Заключение администрации лечебного учреждения об отсутствии у лиц, сдавших пробы, инфекционных заболеваний.

6. Документ от сотрудничающей стороны, содержащий обязательства использовать биологические объекты только в научных целях и не допускать их передачу третьей стороне без согласия российского участника договора.

Примечание. Указанный документ представляется при отсутствии этого условия в договоре (контракте, соглашении).

7. При ввозе биологических объектов в Российскую Федерацию иностранная сторона представляет в Минздрав России официальное подтверждение Министерства (Департамента) здравоохранения об отсутствии в биологических объектах инфекционных агентов.

8. При проведении научных исследований, связанных с тематикой инфекционных заболеваний (СПИДа, ВИЧ-инфекции, гепатита и других), в Минздрав России представляется разрешение (согласие) Министерства (Департамента) здравоохранения той страны, в которую будут вывозиться подобные биологические объекты.

9. При ввозе биологических объектов в Российскую Федерацию из-за рубежа по научной тематике инфекционных заболеваний материалы предварительно рассматриваются Минздравом России, и принимается соответствующее решение.

10. Разрешение Постоянного комитета по контролю наркотиков на вывоз (ввоз) биологических объектов.

11. Отчеты о проводимых научных исследованиях, а также перечень публикаций в российских и зарубежных изданиях.

Начальник Управления
научно-исследовательских
медицинских учреждений
С.Б. ТКАЧЕНКО

Приложение
к Временному порядку рассмотрения
документов, представляемых
организациями (учреждениями)
в Министерство здравоохранения
Российской Федерации,
для оформления разрешения
на ввоз в Российскую Федерацию
и вывоз за рубеж биологических
объектов в рамках международного
научного сотрудничества
12 октября 2000 года

I. ХОДАТАЙСТВО ОРГАНИЗАЦИИ (УЧРЕЖДЕНИЯ)

1. Ходатайство представляется на фирменном бланке организации (учреждения) за подписью первого лица с указанием номера контактного телефона / факса и фамилии исполнителя, где указываются:

1.1. Страна, город и полное официальное наименование организации (учреждения, университета и т.п.), куда вывозятся биологические объекты по линии научного международного сотрудничества.

1.2. Вид вывозимых биологических объектов (кровь или ее фракции, сыворотка, моча, слюна, другие биологические жидкости, биоптаты и т.п.).

1.3. Количество единиц по каждому виду биологического объекта.

1.4. Вид упаковки.

1.5. Вид транспортировки:

а) посылка – указать канал отправки посылки;
б) ручная кладь – Ф.И.О. лица, везущего биологические объекты, номер его заграничного паспорта.

II. ДОГОВОР (КОНТРАКТ, СОГЛАШЕНИЕ)

При заключении договоров (контрактов, соглашений) в их структуре должны быть отражены следующие основные разделы:

1. Предмет договора.
2. Условия договора.
3. Обязанности и ответственность сторон по выполнению условий договора.
4. Результаты исследований и их использование сторонами.
5. Сроки действия договора.
6. Описание проводимых экспериментов, планы, графики исследований даются в приложении к договору (контракту, соглашению).

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Комплект документов, подаваемых заявителем на экспертизу для получения разрешения на ввоз (вывоз) биологических объектов

Письмо заявителя на имя руководителя Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития (Росздравнадзора) с просьбой разрешить ввоз (вывоз) биологических объектов. Письмо должно быть составлено на бланке заявителя с указанием его юридического адреса и подписано руководителем учреждения – 1 экз.

Приложение к письму с перечнем ввозимых (вывозимых) биологических объектов, подписанное руководителем учреждения, имеющее отметку Постоянного комитета по контролю наркотиков об отсутствии в составе ввозимых (вывозимых) биологических объектов наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю в Российской Федерации (если приложение содержит более одной страницы, то таким образом должна быть оформлена каждая страница) – 2 экз.

Копия договора [контракт, соглашение, грант (дать расшифровку гранта и основные его положения)] о международном научном сотрудничестве, заверенная печатью заявителя – 1 экз.

Копии учредительных и регистрационных документов организации (учреждения)-заявителя, заверенные нотариально – 1 экз.

Выписка из устава о занятии научно-исследовательской деятельностью, заверенная печатью заявителя – 1 экз.

Заключение администрации лечебного учреждения об отсутствии у лиц, сдавших пробы, инфекционных заболеваний – 1 экз.

Документ от сотрудничающей стороны, содержащий обязательство использовать биологические объекты только в научных целях и не допускать их передачу третьей стороне без согласия российского участника договора (представляется при отсутствии этого условия в договоре).

При ввозе биологических объектов в РФ иностранная сторона представляет в Росздравнадзор официальное подтверждение Министерства (Департамента) здравоохранения об отсутствии в БО инфекционных агентов.

При проведении научных исследований, связанных с тематикой инфекционных заболеваний (СПИДа, ВИЧ-инфекции, гепатита и др.), в Росздравнадзор представляется разрешение (согласие) Министерства (Департамента) здравоохранения той страны, в которую будут вывозиться подобные БО.

При ввозе БО в РФ из-за рубежа по научной тематике инфекционных заболеваний материалы предварительно рассматриваются в Росздравнадзоре, и принимается соответствующее решение.

Отчеты о проводимых научных исследованиях, а также перечни публикаций в российских и зарубежных изданиях.

УДК 577.21:576.364:615-085:576.367

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки: проблемы и перспективы применения в заместительной клеточной терапии

С. П. Медведев¹, А. И. Шевченко¹, С. М. Закиян^{1,2*}¹Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. ак. Лаврентьева, 10²Научный центр клинической и экспериментальной медицины СО РАМН, 630117,

Новосибирск, ул. ак. Тимакова, 2

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

Поступила в редакцию 10.04.2010 г.

РЕФЕРАТ Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) – новый тип плюрипотентных клеток, которые можно получать путем репрограммирования дифференцированных клеток животных и человека. В обзоре рассматриваются вопросы, связанные с природой ИПСК, приведено описание различных методик получения ИПСК. Особое внимание уделено рассмотрению методов, направленных на получение ИПСК человека без генетической модификации геномов клеток, и способов повышения эффективности получения ИПСК. Рассматриваются вопросы возможности и безопасности применения ИПСК в заместительной клеточной терапии заболеваний человека и исследовании новых лекарственных веществ.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА репрограммирование клеток, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, направленная дифференцировка стволовых клеток, клеточная терапия.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ЭСК – эмбриональные стволовые клетки, ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, НСК – нейральные стволовые клетки, СКЖТ – стволовые клетки жировой ткани, ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота, кДНК – кодирующая дезоксирибонуклеиновая кислота, РНК – рибонуклеиновая кислота, мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота, ФКС – фибробласты кожных сосочков, КМ – кардиомиоциты, СМА – спинальная мышечная атрофия, СМА-ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, полученные из фибробластов пациентов, страдающих спинальной мышечной атрофией, GFP – green fluorescent protein (белок, флуоресцирующий зеленым светом), LTR – long terminal repeat (длинный концевой повтор).

ИНДУЦИРОВАННАЯ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТЬ

Плюрипотентные стволовые клетки являются уникальным объектом для исследования множества процессов, происходящих во время раннего развития млекопитающих, а также перспективным инструментом при клеточной терапии заболеваний человека. Уникальность данных клеток состоит в способности, находясь в культуре, неограниченное время поддерживать самообновление и давать после дифференцировки все клеточные типы, из которых состоит взрослый организм [1]. Плюрипотентность поддерживается сложной системой сигнальных молекул и генной сети, специфической для плюрипотентных клеток. Центральное положение в иерархии генов, участвующих в поддержании плюрипотентности, занимают *Oct4*, *Sox2*

и *Nanog*, кодирующие транскрипционные факторы [2, 3]. Совместное действие сигнальных молекул, действующих извне, и внутренних факторов приводит к формированию специфического паттерна экспрессии генов, а также состояния эпигенома, характерного для стволовых клеток. Во время направленной или спонтанной дифференцировки происходят изменения паттерна экспрессии генов, а также широкомасштабные эпигенетические трансформации, приводящие к установлению транскриптома и эпигенома, характерных для конкретного типа клеток.

До недавнего времени единственным хорошо изученным источником плюрипотентных стволовых клеток были эмбриональные стволовые клетки (ЭСК). ЭСК получают из внутренней клеточной массы и эпибласта бластоцист

[4–6]. В настоящий момент известен ряд протоколов получения различных клеточных производных из ЭСК человека. Однако использование ЭСК в заместительной клеточной терапии ограничено. Первая причина ограничения заключается в иммунной несовместимости донорских клеток и организма реципиента, что может приводить к отторжению трансплантированных клеток. Вторая причина носит этический характер, поскольку во время получения ЭСК эмбрион погибает. Первая проблема может быть решена с помощью пересадки ядра из соматической клетки в яйцеклетку с последующим получением эмбриона и ЭСК. При пересадке ядра из соматической клетки в яйцеклетку происходит репрограммирование генома за счет факторов, находящихся в цитоплазме. Такой способ получения плюрипотентных клеток от конкретного индивидуума получил название «терапевтическое клонирование». Однако данный метод технологически сложен, эффективность репрограммирования крайне низка. Кроме того, этот подход наталкивается на уже упомянутые проблемы этического характера, на этот раз связанные с получением большого числа яйцеклеток человека [7].

В 2006 г. была впервые опубликована работа, описывающая получение плюрипотентных клеток путем эктопической экспрессии четырех генов: *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc* в эмбриональных и взрослых фибробластах мыши [8]. Плюрипотентные клетки, полученные из соматических, были названы индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками (ИПСК). С помощью данного набора факторов (*Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc*) ИПСК получены из различных типов дифференцированных клеток мыши [9–14] и человека [15–17]. Кроме того, ИПСК человека были получены с помощью несколько измененного набора генов: *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* и *LIN28* [18]. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки очень сходны с эмбриональными стволовыми клетками по широкому ряду характеристик. Они обладают сходной морфологией и способом роста, одинаково чувствительны к ростовым факторам и сигнальным молекулам. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, как и эмбриональные стволовые клетки, способны дифференцироваться *in vitro* в производные всех трех первичных зародышевых листков (эктодермы, энтодермы и мезодермы), а также формировать тератомы при подкожной инъекции иммунодефицитным мышам. ИПСК мыши, инъецированные в бластоцисты, нормально включаются в развитие, приводя к формированию животных с высокой степенью химеризации. Более того, ИПСК мыши способны развиваться в целый организм при инъекции в тетраплоидные бластоцисты [19, 20]. Таким образом, в руках исследователей оказался замечательный метод, позволяющий получать плюрипотентные стволовые клетки из соматических клеток различных типов, избегая проблем этического плана.

ПРОБЛЕМА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ ИПСК И БЕЗОПАСНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ В ЗАМЕСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ

В первых работах по получению индуцированных плюрипотентных стволовых клеток мыши и человека для доставки генов *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc* в соматические клетки применялись векторы на основе ретро- и лен-

тивирусов. Ретровирусы обладают достаточно высокой эффективностью трансдукции, хотя и не одинаковой для различных типов клеток. При использовании интеграции ретровирусов в геном клетки хозяина необходимо, чтобы эта клетка имела довольно высокий темп деления, что характерно для довольно ограниченного спектра клеток, которые можно поддерживать в культуре. Кроме того, транскрипция, происходящая с ретровирусной конструкцией и управляемая промотором, находящимся в 5'LTR (long terminal repeat), прекращается при переходе соматической клетки в плюрипотентное состояние [21]. Это свойство делает ретровирусы привлекательными при получении ИПСК. Однако ретровирусы обладают рядом свойств, делающих ИПСК, полученные с их помощью, непригодными для использования в клеточной терапии болезней человека. Во-первых, ретровирусная ДНК интегрируется в геном клетки-хозяина. Интеграция происходит в случайном порядке, не существует каких-либо специфических последовательностей либо закономерностей интеграции ретровирусов. Число копий экзогенной ретровирусной ДНК, которая интегрируется в геном, может сильно варьировать [15]. Ретровирусы, интегрирующиеся в геном клетки, могут привносить промоторные элементы, сигналы полиаденилирования, встраиваться в кодирующие части генов, вызывая нарушение транскрипции. Во-вторых, поскольку уровень транскрипции экзогенных *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc* в ретровирусной конструкции снижается при переходе клеток в плюрипотентное состояние, это может приводить к уменьшению эффективности получения стабильных линий ИПСК, так как процесс переключения от экзогенной экспрессии генов плюрипотентности к эндогенной может не произойти. В-третьих, некоторые исследования показывают, что в ретровирусных конструкциях может возобновляться транскрипция трансгенов в клетках производных ИПСК [22]. Высокая вероятность возобновления эктопической экспрессии генов *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc* делает невозможным использование ИПСК, полученных с помощью ретровирусов, для клинических исследований, кроме того, данные ИПСК сложно применять даже в фундаментальных исследованиях основ репрограммирования и плюрипотентности клеток. Lentивирусы, которые используются для получения ИПСК, также обладают способностью интегрироваться в геном и сохранять транскрипционную активность в плюрипотентных клетках. Выходом из данной ситуации является использование промоторов, управляемых веществами, добавляемыми в культуральную среду, например тетрациклином или доксициклином, что позволяет регулировать транскрипцию трансгенов. ИПСК уже получены с помощью подобных систем [23].

Другая серьезная проблема заключается в самом наборе генов, используемом для индукции плюрипотентности [22]. Эктопическая транскрипция генов *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc* может вызывать развитие раковых новообразований из клеток, предшественниками которых были ИПСК, так как экспрессия генов *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc* ассоциирована с развитием множества видов опухолей, известных в онкогенетике [22, 24]. В частности, показано, что сверхэкспрессия *Oct4* вызывает дисплазию клеток эпителия у мышей [25], аберрантная экспрессия *Sox2* вызывает развитие

зубчатых полипов и слизистой карциномы толстой кишки [26], в опухолях молочной железы наблюдается повышение экспрессии гена *Klf4* [27], а нарушение экспрессии гена *c-Myc* наблюдается в 70 % всех типов рака у человека [28]. Развитие опухолей наблюдается у ~ 50 % химерных мышей, полученных при инъекции ретровирусных ИПСК в бластоцисты, что, вероятнее всего, связано с реактивацией экзогенного *c-Myc* [29, 30].

Существует несколько возможных стратегий решения описанных выше проблем:

- поиск менее «канцерогенного» набора генов, необходимых и достаточных для репрограммирования;
- уменьшение числа генов, необходимых для репрограммирования, поиск негенетических факторов, способствующих репрограммированию;
- поиск систем, позволяющих удалить экзогенную ДНК из генома клетки после репрограммирования;
- разработка способов доставки в клетку генетических конструкций, которые не интегрируются в ее геном;
- поиск способов репрограммирования соматических клеток с использованием рекомбинантных белков.

ГЕНЫ, КОТОРЫЕ МОГУТ ЗАМЕНИТЬ *c-Myc* И *Klf4* ПРИ ПОЛУЧЕНИИ ИПСК

Эктопическая экспрессия генов *c-Myc* и *Klf4* является наиболее опасной из-за высокой вероятности образования злокачественных опухолей [22]. Следовательно, необходимо найти другие гены, которые могли бы заменить *c-Myc* и *Klf4* при получении ИПСК. Было показано, что при репрограммировании соматических клеток человека эти гены могут быть с успехом заменены генами *NANOG* и *LIN28* [18]. Кроме того, ИПСК были получены из эмбриональных фибробластов мыши с помощью сверхэкспрессии генов *Oct4*, *Sox2*, а также гена *Esrrb*, кодирующего ядерный орфановый рецептор. Ранее было показано, что *Esrrb*, действующий как активатор транскрипции таких генов, как *Oct4*, *Sox2* и *Nanog*, необходим для самообновления и поддержания плюрипотентности ЭСК мыши. Более того, *Esrrb* может позитивно регулировать ген *Klf4*. Таким образом, факторы, вызывающие повышенную канцерогенность ИПСК и их производных, могут быть с успехом заменены менее «опасными» генами [31].

МЕТОДЫ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ ИПСК

Клеточные линии, наиболее эффективно подвергающиеся репрограммированию

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки мыши и человека могут быть получены из фибробластов без использования *c-Myc* с помощью трех факторов: *Oct4*, *Sox2* и *Klf4*. Однако при этом наблюдается замедление процесса репрограммирования и значительное снижение выхода стабильных клонов ИПСК [32, 33]. Снижение числа необходимых факторов без потери эффективности возможно при получении ИПСК из нейтральных стволовых клеток (НСК) мыши и человека [12, 34, 35]. Так, ИПСК были получены из нейтральных стволовых клеток, выделенных из мозга взрослой мыши, с помощью факторов *Oct4* и *Klf4*, а также одного фактора *Oct4* [12, 34]. Позже были получены

ИПСК человека путем репрограммирования фетальных НСК после трансдукции ретровирусом, несущим кДНК только одного гена – *OCT4* [35]. Наиболее вероятно, что отсутствие необходимости использования факторов *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc* связано с высоким эндогенным уровнем экспрессии этих генов в НСК.

Успешного репрограммирования удалось добиться и при исследовании других линий клеток, в частности меланоцитов, имеющих нейроэктодермальное происхождение [36]. Меланоциты мыши и человека характеризуются достаточно высоким уровнем экспрессии гена *Sox2*, особенно на ранних пассажах. ИПСК из меланоцитов мыши и человека удалось получить без использования *Sox2* или *c-Myc*. Однако эффективность получения клонов ИПСК из меланоцитов мыши была снижена (0.03 % без *Sox2*; 0.02 % без *c-Myc*) по сравнению с выходом клонов при использовании всех четырех факторов на меланоцитах (0.19 %) и фибробластах (0.056 %). Снижение эффективности при неиспользовании *Sox2* или *c-Myc* наблюдали и при репрограммировании меланоцитов человека (0.05 % – при использовании всех четырех факторов и 0.01 % – при удалении *Sox2* или *c-Myc*). Попытки получить стабильные клоны ИПСК из меланоцитов одновременно без *Sox2* и *c-Myc* потерпели неудачу [36]. Таким образом, задачу уменьшения числа факторов, необходимых для получения ИПСК, можно решить путем удачного выбора типа соматических клеток, наиболее эффективно подвергающихся репрограммированию меньшим числом факторов, например за счет эндогенной экспрессии «генов плюрипотентности». Однако, если речь идет о получении ИПСК человека, подобные соматические клетки должны быть широко доступны, относительно легко культивироваться, и способ их получения должен быть как можно менее инвазивным.

Одним из таких типов клеток могут быть стволовые клетки жировой ткани (СКЖТ). Это гетерогенная группа мультipotентных клеток, которые сравнительно легко и в большом количестве получают из жировой ткани после операций по липоаспирации. ИПСК человека были успешно получены из СКЖТ, причем скорость репрограммирования была выше в 2 раза, а эффективность – в 20 раз (0.2 %), чем соответствующие показатели при репрограммировании фибробластов [37].

Еще более доступным ресурсом для эффективного получения ИПСК человека являются кератиноциты. ИПСК человека были получены из кератиноцитов с эффективностью, в 100 раз превышающей таковую у фибробластов кожи. Кроме того, скорость репрограммирования была в 2 раза выше, чем при репрограммировании фибробластов [38].

Недавно было обнаружено, что фибробласты кожных сосочков (ФКС) мыши могут быть с высокой эффективностью репрограммированы в ИПСК с помощью сверхэкспрессии всего двух генов: *Oct4* и *Klf4* – в составе ретровирусных векторов [39]. ФКС – это специализированный тип клеток, имеющих мезодермальное происхождение, окружающий стволовые клетки волосных фолликулов. Характерной чертой данных клеток является наличие эндогенной экспрессии генов *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc*, а также щелочной фосфатазы – одного из маркеров ЭСК мыши и человека. ФКС можно достаточно легко отделить от остальных ти-

пов клеток кожи посредством клеточного сортирования (FACS, fluorescence activated cell sorting) с использованием прижизненного окрашивания антителами к поверхностным антигенам, характерным для того или иного типа клеток. Эффективность репрограммирования ФКС четырьмя факторами (Oct4, Sox2, Klf4 и с-Мус) с использованием ретровирусов составляет 1.38 %, что в 1000 раз больше, чем эффективность репрограммирования фибробластов кожи с применением той же системы. Двумя факторами – Oct4 и Klf4 – ФКС репрограммируются с эффективностью 0.024 %, что сравнимо с эффективностью репрограммирования фибробластов кожи с использованием всех четырех факторов. Эффективность репрограммирования ФКС сравнима с таковой у нейтральных стволовых клеток, при этом способ выделения линий ФКС гораздо менее инвазивен и более стабилен [39]. Вероятно, использование линий ФКС возможно и для человека; этот тип клеток может быть одним из наиболее перспективных при получении ИПСК человека для фармакологических исследований и заместительной клеточной терапии. Особенно актуальным является применение на подобных типах клеток, более эффективно поддающихся репрограммированию, методов доставки «генов плюрипотентности», позволяющих избежать интеграции чужеродной ДНК в геном, а также химических соединений, повышающих эффективность репрограммирования и заменяющих собой некоторые необходимые для репрограммирования факторы.

Химические соединения, повышающие эффективность репрограммирования клеток

Как уже отмечалось выше, снижение числа факторов, используемых для репрограммирования, снижает эффективность получения ИПСК. Однако в последнее время появилось несколько работ, в которых показано, что использование генетических механизмов, т.е. запуск эктопической экспрессии генов, можно заменить использованием химических соединений, основная часть которых действует на эпигенетическом уровне. Так, показано, что использование соединения VIX-01294, которое является ингибитором гистон-метилтрансферазы G9a, позволяет репрограммировать фибробласты мыши с использованием всего двух факторов – Oct4 и Klf4, при этом эффективность получения клонов ИПСК повышается в 5 раз по сравнению с экспериментом, где ИПСК получали без VIX-01294 [40]. Комбинация VIX-01294 с другими соединениями еще больше повышает эффективность репрограммирования. Так, например, комбинация VIX-01294 с ВауК8644 повышает эффективность получения ИПСК в 15, а с RG108 – в 30 раз, при этом для репрограммирования использовались всего два фактора: Oct4 и Klf4. RG108 является ингибитором ДНК-метилтрансфераз, и его роль в процессе репрограммирования, очевидно, заключается в запуске более быстрого и эффективного деметилирования промоторов генов, специфичных для плюрипотентных клеток, в то время как ВауК8644 является антагонистом кальциевых каналов L-типа, и его роль в процессе репрограммирования не вполне ясна [40]. Еще более весомые результаты были получены при репрограммировании нейтральных стволовых клеток мыши. Использование VIX-01294 позволило в 1.5 раза повысить эффективность полу-

чения ИПСК с помощью двух факторов: Oct4 и Klf4, даже по сравнению с репрограммированием всеми четырьмя факторами. Более того, VIX-01294 может заменить даже Oct4 при репрограммировании нейтральных стволовых клеток, хотя это происходит с очень низкой эффективностью [41]. Вальпроевая, или 2-пропилвалериановая кислота, являющаяся ингибитором гистондеацетилазы, также способна заменить с-Мус при репрограммировании фибробластов мыши и человека. Вальпроевая кислота повышает эффективность репрограммирования фибробластов мыши в 50 раз, а фибробластов человека – в 10–20 раз при использовании трех факторов [42, 43]. Помимо вальпроевой кислоты повышению эффективности репрограммирования способствуют другие ингибиторы деацетилаз: TSA (trichostatin A) и SAHA (suberoylanilide hydroxamic acid). TSA повышает эффективность репрограммирования фибробластов мыши в 15 раз, а SAHA – в 2 раза при использовании всех четырех факторов [42]. Кроме веществ, действующих на эпигенетическом уровне, для замены факторов можно использовать соединения, ингибирующие белки – компоненты сигнальных путей, задействованных в дифференцировке плюрипотентных клеток. Например, ингибиторы киназ MEK и GSK3 (PD0325901 и CHIR99021 соответственно) способствуют установлению полной, стабильной плюрипотентности ИПСК, получаемых из нейтральных стволовых клеток мыши с помощью двух факторов: Oct4 и Klf4 [41, 44].

Недавно было показано, что эффективность репрограммирования соматических клеток могут существенно повышать вещества, обладающие антиоксидантной активностью. Аскорбиновая кислота (витамин С) способна существенно влиять на эффективность получения ИПСК мыши и человека из различных типов соматических клеток [45]. Было показано, что трансдукция эмбриональных фибробластов мыши (ЭФМ) ретровирусами, несущими гены *Oct4*, *Sox2* и *Klf4*, вызывает существенное по сравнению с контролем и эмбриональными фибробластами, трансдуцированными генами *Oct4*, *Sox2*, *c-Myc* и *Klf4*, повышение продукции активных форм кислорода (АФК). Повышение уровня АФК, в свою очередь, вызывает быстрое старение клетки и повышенный уровень апоптоза, что не может не сказываться на эффективности репрограммирования клеток. Протестировав несколько веществ, обладающих антиоксидантной активностью, таких, как витамин В1, селенит натрия, восстановленный глутатион, аскорбиновая кислота, авторы обнаружили, что комбинация этих веществ повышает выход GFP-позитивных клеток при репрограммировании эмбриональных фибробластов (ген *Gfp* находился под контролем промотора гена *Oct4*). Применение данных веществ по отдельности показало, что только аскорбиновая кислота обладает ярко выраженным свойством повышать уровень GFP-позитивных клеток, хотя остальные вещества сохраняют способность снижать уровень АФК. По всей видимости, данное свойство аскорбиновой кислоты не связано напрямую с ее антиоксидантной активностью [45]. Подсчет GFP-позитивных колоний ИПСК, экспрессирующих щелочную фосфатазу, показал, что эффективность получения ИПСК тремя факторами Oct4, Sox2 и Klf4 из ЭФМ в присутствии аскорбиновой кислоты может достигать 3.8 %. Применение всех четырех факторов Oct4, Sox2, Klf4 и с-Мус совмест-

но с аскорбиновой кислотой позволяет получать колонии ИПСК с эффективностью около 8.75 %. Повышение выхода ИПСК наблюдалось и при репрограммировании фибробластов молочной железы мыши, т.е. действие витамина С не специфично для одного типа клеток. Более того, действие витамина С на эффективность репрограммирования носит более выраженный характер, чем действие ингибитора деацетилаз – 2-пропилвалериановой (вальпроевой) кислоты. Совместное действие витамина С и вальпроевой кислоты имеет аддитивный характер, т.е. данные вещества имеют разный механизм действия. Кроме того, витамин С способствует переходу т.н. пре-ИПСК к стабильному плюрипотентному состоянию. Данное свойство витамина С сходно с действием веществ PD0325901 и CHIR99021, являющихся ингибиторами киназ MEK и GSK3 соответственно. Подобное действие витамина С распространяется и на клетки человека [45]. Так, авторами были получены ИПСК после трансдукции фибробластов человека ретровирусами, несущими *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc*, и обработки аскорбиновой кислотой с эффективностью до 6.2 %. При репрограммировании подобным образом стволовых клеток жировой ткани эффективность доходила до 7.06 %. Механизм действия витамина С на эффективность репрограммирования остается не до конца ясным. Однако было замечено увеличение темпа пролиферации клеток на промежуточном этапе репрограммирования. Кроме того, было обнаружено снижение уровня белков p53 и p21 в клетках, обрабатываемых аскорбиновой кислотой, при одновременно нормально работающей машине репарации повреждений ДНК [45]. Интересно, что ранее было показано существенное снижение эффективности получения ИПСК под действием процессов, запускаемых белками p53 и p21 [46–50].

МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ ИПСК БЕЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ ГЕНОМА КЛЕТОК

Как уже отмечалось выше, первоначально для получения ИПСК мыши и человека в качестве векторов для доставки генов, необходимых для репрограммирования, были применены ретро- и лентивирусы. Основным недостатком данного метода является неконтролируемая интеграция провирусной ДНК в геном клетки. В настоящее время рядом групп ученых предложены методы доставки «генов плюрипотентности» в клетку-реципиент, которые не предусматривают интеграцию чужеродной ДНК в геном либо предусматривают возможность удаления экзогенных генетических конструкций из генома.

Cre-loxP-опосредованная рекомбинация

Для получения ИПСК людей, страдающих болезнью Паркинсона, были применены лентивирусы, провирусы которых могут удаляться из генома клетки посредством *Cre*-рекомбиназы. Для этого *loxP*-сайт был помещен в 3' LTR-районы лентивирусов, содержащих отдельные репрограммирующие гены под контролем доксициклин-индуцибельного промотора. Во время репликации вируса *loxP* дуплицировался в 5' LTR вектора. В результате интегрирующийся в геном провирус фланкировался двумя *loxP*-сайтами. Удаление встроок производилось с помощью временной трансфекции ИПСК вектором, экспрессирующим *Cre*-рекомбиназу [51].

В другой работе для получения ИПСК мыши была использована плазида, несущая гены *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc* в одной рамке считывания, в которой отдельные кДНК были разделены последовательностями, кодирующими 2А пептиды, при этом практически вся конструкция была фланкирована *loxP*-сайтами [52]. Использование такого вектора позволило значительно снизить количество интеграций экзогенной ДНК в геном клеток-реципиентов и, следовательно, упростить их дальнейшую эксцизию [52]. Ранее с использованием лентивирусов, несущих подобные полицистронные конструкции, было показано, что наличие одной копии трансгена, обеспечивающего высокий уровень экспрессии экзогенных факторов *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc*, достаточно для репрограммирования дифференцированных клеток к плюрипотентному состоянию [53, 54].

Недостатком *Cre-loxP*-системы является то, что вырезание интегрирующихся участков происходит не полностью, и в геноме остается, по крайней мере, последовательность *loxP*-сайта, из-за чего сохраняется риск появления инсерционных мутаций.

Плазмидные векторы

Применение лентивирусов и плазмид, несущих *loxP*-сайты, необходимые для удаления трансгенной конструкции, хотя и незначительно, но все-таки модифицирует геном клетки-реципиента. Выходом из данной ситуации является применение векторных систем, которые вообще не предусматривают интеграцию вектора или его частей в геном клетки. Одна из таких систем, заключающаяся в использовании временной трансфекции полицистронных плазмидных конструкций, была использована для получения ИПСК из эмбриональных фибробластов мыши [29]. Полицистронную плазмиду, несущую кДНК генов *Oct4*, *Sox2* и *Klf4*, а также плазмиду, экспрессирующую ген *c-Myc*, трансфицировали в эмбриональные фибробласты мыши на 1-е, 3-е, 5-е и 7-е сут после их первичного посева, на 9-й день фибробласты пассировали, а на 25-й день отбирали колонии ИПСК. Из 10 проведенных по данному протоколу экспериментов в 7 авторам удалось получить GFP-позитивные колонии (ген *Gfp* находился под контролем промотора гена *Nanog*). Полученные ИПСК по своим свойствам были сходны с ЭСК мыши и не содержали в своем геноме встроок ДНК использованных конструкций. Таким образом, было показано, что полные ИПСК мыши могут быть воспроизводимо получены без интеграции трансгенов, и для запуска репрограммирования достаточно временной сверхэкспрессии генов *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc*. Главным недостатком данного метода является его низкая эффективность. В 10 экспериментах удалось получить от 1 до 29 колоний ИПСК на 10^6 фибробластов, при этом при использовании ретровирусов на таком же количестве клеток авторами данной работы были получены до 1000 колоний [29].

Эписомные векторы

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки человека были успешно получены из фибробластов кожи с помощью единичной трансфекции полицистронными эписомными конструкциями, содержащими различные

комбинации генов *Oct4*, *Sox2*, *Nanog*, *Klf4*, *c-Myc*, *Lin28* и *SV40LT*. Данные конструкции были построены на основе вектора oriP/EBNA1 (Epstein-Barr nuclear antigen-1) [55]. В векторе oriP/EBNA1 для линкирования участков, кодирующих необходимые для успешного репрограммирования гены, использовалась последовательность IRES2, позволяющая экспрессировать несколько отдельных кДНК в составе одной полицистронной мРНК, с которой в дальнейшем транслируется несколько белков. Вектор oriP/EBNA1 характеризуется также тем, что в клетках приматов он поддерживается как низкокопийная плаزمиды и способен реплицироваться один раз за клеточный цикл (следовательно, не происходит быстрой элиминации вектора, как в случае с обычными плазмидами). Плазмиды элиминируются в отсутствие селекции со скоростью примерно 5 % за клеточный цикл [56]. В работе тестировали большой спектр различных комбинаций репрограммирующих факторов, и в итоге наилучшая эффективность репрограммирования была достигнута при котрансфекции трех эписом, содержащих следующие наборы генов: *Oct4 + Sox2 + Nanog + Klf4*, *Oct4 + Sox2 + SV40LT + Klf4*, *c-Myc + Lin28*. *SV40LT* (*SV40 large T gene*) нейтрализует возможный токсический эффект от сверхэкспрессии *c-Myc* [57]. Авторами было показано, что полноценные ИПСК, обладающие всеми характеристиками плюрипотентных клеток, могут быть получены после временной экспрессии определенной комбинации генов в соматических клетках человека без интеграции эписомной ДНК в геном. Однако, как и при использовании плазмидных векторов, данный способ репрограммирования отличается низкой эффективностью. Авторам удалось получить в отдельных экспериментах от 3 до 6 стабильных колоний ИПСК на 10^6 трансфицированных фибробластов [55]. Несмотря на то что фибробласты кожи относительно легко культивируются и доступны, вероятнее всего, требуется поиск клеточных типов, которые легче и эффективнее подвергаются репрограммированию данным способом. Еще одно ограничение использования представленной выше системы заключается в том, что эписомы данного типа неодинаково эффективно поддерживаются в разных типах клеток.

PiggyBac-транспозиция

Одна из перспективных систем, используемых для получения ИПСК без модификации генома клеток, основана на применении ДНК-транспозонов. Так называемые *PiggyBac*-транспозоны, содержащие 2A-линкированные репрограммирующие гены, расположенные между 5'- и 3'-терминальными повторами, были использованы для получения ИПСК из фибробластов. Интеграция данных конструкций в геном осуществляется за счет совместной трансфекции с плазмидой, кодирующей транспозазу. После репрограммирования в результате кратковременной экспрессии транспозазы происходило удаление встроок из генома [58, 59]. Преимущество *PiggyBac*-системы перед *Cre-loxP* заключается в том, что экзогенная ДНК удаляется полностью [60].

Однако, несмотря на то что эффективность вырезания экзогенной ДНК из генома методом *PiggyBac*-транспозиции достаточно высока, все же удаление большого числа копий транспозона трудно достижимо.

Неинтегрирующиеся вирусные векторы

Индуктированные плюрипотентные стволовые клетки мыши были успешно получены из гепатоцитов и фибробластов в результате использования 4 аденовирусных векторов, не интегрирующихся в геном и несущих гены *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc*. Анализ ИПСК, полученных таким образом, показал, что они по своим свойствам (образование тератом, метилирование ДНК промоторных областей генов, экспрессия маркеров плюрипотентности) близки к ЭСК мыши, однако не несут в геноме встроок вирусной ДНК [61]. Позже данным методом были получены ИПСК из фибробластов человека [62].

Авторы отмеченных работ утверждают, что при использовании аденовирусных векторов можно получать ИПСК, пригодные для применения без риска проявления вирусной или онкогенной активности. Недостатками метода являются крайне низкая эффективность (0.0001–0.001 %), замедление процесса репрограммирования и вероятность образования тетраплоидных клеток. Кроме того, не все типы клеток одинаково чувствительны к трансдукции аденовирусами.

Недавно для получения ИПСК человека был применен еще один способ доставки генов, основанный на использовании вирусов. В данном случае был использован вектор на основе вируса Сендай (SeV) [63]. Сендай – РНК-содержащий вирус, не модифицирующий геном клеток-реципиентов, – представляет собой хороший вектор для экспрессии необходимых факторов в репрограммируемых клетках. Векторы, содержащие все «факторы плюрипотентности» либо 3 фактора (не содержащие *c-Myc*), использовались для репрограммирования фибробластов человека. Впоследствии векторная конструкция, полученная на основе SeV, элиминировалась в ходе пролиферации клеток. Кроме того, имеется возможность удалять клетки, в которые произошла интеграция провируса, посредством негативной селекции против поверхностного антигена HN, представленного на инфицированных клетках. Авторы утверждают, что технология репрограммирования, основанная на SeV, позволит получать клинически применимые ИПСК человека [63].

Трансдукция клеток рекомбинантными белками

Несмотря на то что существуют методы получения ИПСК без генетической модификации генома клеток (аденовирусный, плазмидный перенос генов и др.), теоретическая вероятность того, что экзогенная ДНК интегрируется в геном клетки, все-таки сохраняется. Мутагенность веществ, применяемых в настоящий момент для повышения эффективности получения ИПСК, тоже до конца не изучена. Полная проверка генома получаемых ИПСК на наличие инсерций экзогенной ДНК и прочих мутаций представляет собой трудную, а при массовом культивировании множества линий – невыполнимую задачу. Решением данной проблемы может быть использование готовых белковых факторов, доставляемых в дифференцированную клетку вместо экзогенной ДНК. В данный момент уже опубликованы две работы, в которых ИПСК мыши и человека были получены с помощью рекомбинантных белков OCT4, SOX2, KLF4 и C-MYC [64, 65]. Метод доставки белков в клетку основан на способности пептидов, обогащенных основными остатками (например, аргинином или лизином), проникать через

клеточную мембрану. ИПСК мыши были получены с помощью рекомбинантных белков OCT4, SOX2, KLF4 и C-МYC, экспрессированных в кишечной палочке, которые содержали на С-концах тракты из 11 остатков аргинина. Авторам удалось получить ИПСК мыши в результате четырех раундов трансдукции белков в эмбриональные фибробласты [65]. Однако ИПСК были получены только в том случае, когда клетки были дополнительно обработаны ингибитором деацетилаз – 2-пропилвалериановой кислотой. Для получения ИПСК человека с помощью белков был использован тот же принцип, однако экспрессия белков проводилась в клетках человека HEK293, белки экспрессировали с фрагментом из 9 остатков аргинина на С-конце белка. После шести раундов трансдукции исследователям удалось получить ИПСК человека без обработки какими-либо дополнительными веществами [64]. Эффективность получения ИПСК человека данным способом составила 0.001 %, что на порядок ниже эффективности репрограммирования при использовании ретровирусов. Несмотря на это, данный метод является крайне перспективным при получении пациент-специфичных ИПСК.

ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ – МОДЕЛИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПАТОГЕНЕЗА ЗАБОЛЕВАНИЙ И ИСТОЧНИК МАТЕРИАЛА ДЛЯ ЗАМЕСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ

Первые линии плюрипотентных эмбриональных стволовых клеток человека были получены в 1998 г. [6]. Помимо явной фундаментальной значимости исследований эмбриональных стволовых клеток, касающихся множества процессов, происходящих во время раннего эмбриогенеза, огромный интерес ученых привлекла возможность использовать ЭСК и их производных в качестве моделей для исследования патогенеза заболеваний человека, тестирования новых лекарств и заместительной клеточной терапии. На данный момент исследования направленной дифференцировки ЭСК человека и возможности их использования для коррекции дегенеративных заболеваний достигли большого прогресса. В результате дифференцировки ЭСК можно получать функциональные типы клеток: мотормые и дофаминэргические нейроны, кардиомиоциты, предшественники клеток гематопоэтического ряда. Данные клеточные производные по своим биохимическим и физиологическим свойствам потенциально пригодны для терапии сердечно-сосудистых заболеваний, болезней нервной системы, заболеваний крови человека [66]. Более того, производные, полученные из ЭСК, были успешно применены для лечения заболеваний на модельных животных. Так, предшественники клеток крови, полученные из ЭСК, были с успехом применены для коррекции иммунодефицита у мышей. С помощью фоторецепторов, полученных из ЭСК человека, была восстановлена функция зрения у слепых мышей, а на крысах, моделирующих развитие болезни Паркинсона, с помощью дофаминэргических нейронов, полученных из ЭСК человека, восстановлена нормальная функциональность нервной системы [67–70]. Несмотря на явные успехи, полномасштабное применение ЭСК в терапии и моделировании заболеваний затруднено, поскольку для этого необходимо создание банков ЭСК, соответствующих всем HLA-гаплотипам,

что практически нереально и затруднено из-за проблем технического и этического характера.

Альтернативой ЭСК в области клинического применения в заместительной клеточной терапии и скрининге новых лекарственных средств могут стать индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. На сегодняшний день известно, что ИПСК по своим свойствам крайне близки к ЭСК и в то же время могут быть получены в практически неограниченном количестве из дифференцированных клеток каждого конкретного пациента. Несмотря на то что первые ИПСК были получены сравнительно недавно, работы по направленной дифференцировке ИПСК и получению пациент-специфичных ИПСК ведутся активно, и уже наметился значительный прогресс в данной области.

Из ИПСК человека путем направленной дифференцировки *in vitro* были получены дофаминэргические и мотонейроны [71, 72]. Данные виды нейронов повреждаются при многих видах врожденных и приобретенных заболеваний человека, таких, как механическое повреждение спинного мозга, болезнь Паркинсона, спинальная мышечная атрофия, амиотрофный латеральный склероз. Несколькими группами исследователей удалось получить из ИПСК мыши и человека различные типы клеток сетчатки глаза [73–75]. Было показано, что ИПСК человека могут спонтанно дифференцироваться *in vitro* в клетки пигментированного эпителия сетчатки [76]. Еще одной группой исследователей было продемонстрировано, что обработка ИПСК мыши и человека антагонистами WNT и NODAL в суспензионной культуре вызывает появление маркеров клеток-предшественников и клеток пигментированного эпителия. Дальнейшая обработка клеток ретиновой кислотой и таурином активизирует появление клеток, экспрессирующих маркеры фоторецепторов [75].

Несколькими группами исследователей из ИПСК мыши и человека были получены *in vitro* функциональные кардиомиоциты (КМ) [77–81]. По своим характеристикам, включающим морфологию, экспрессию маркеров, электрофизиологические показатели и чувствительность к химическим веществам, получаемые из ИПСК кардиомиоциты очень сходны с КМ сердечной мышцы и с КМ, получаемыми при дифференцировке ЭСК. Более того, показано, что инъекции ИПСК мыши могут восстанавливать повреждения мышечной и эндотелиальной тканей сердца, вызываемые инфарктом миокарда [77].

Кроме уже перечисленных типов дифференцированных клеток к настоящему моменту из ИПСК мыши и человека получены: гепатоцитоподобные клеточные производные, дендритные клетки и макрофаги, кластеры инсулинпродуцирующих клеток, подобные клеткам островков Лангерганса поджелудочной железы, гематопоэтические и эндотелиальные клетки [82–85].

Кроме направленной дифференцировки *in vitro* большие усилия исследователей направлены на получение пациент-специфичных ИПСК. Наличие плюрипотентных клеток конкретных пациентов позволяет исследовать патогенез и проводить эксперименты по терапии наследственных заболеваний, развитие которых связано с конкретным типом клеток, которые тяжело получить путем биопсии, применение ИПСК дает практически неограниченный ресурс для подобных исследований. Возможность лечения

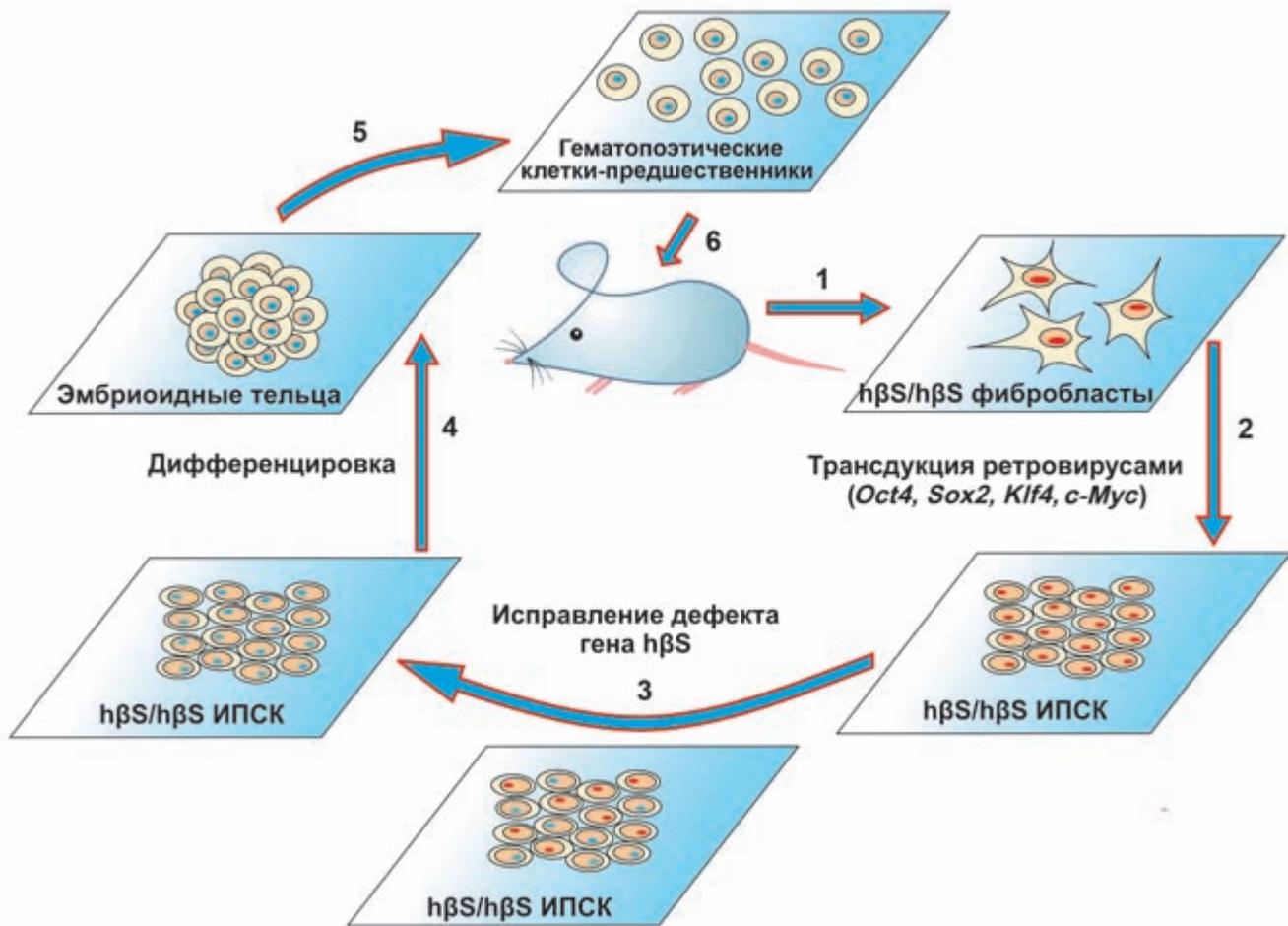


Схема эксперимента по исправлению мутантного фенотипа у мышей, моделирующих развитие серповидно-клеточной анемии [2]. Фибробласты, полученные из хвоста мыши (1), несущей мутантный аллель гена, кодирующего β -цепи гемоглобина человека ($h\beta s$), были использованы для получения ИПСК (2). В ИПСК мутация была исправлена с помощью гомологичной рекомбинации (3), а затем клетки дифференцировали путем образования эмбрионидных телец посредством направленной дифференцировки были получены гематопозитические клетки-предшественники (5), которые затем были инъецированы в мышью, подвергнутую ионизирующему излучению (6).

заболеваний посредством ИПСК была недавно с успехом продемонстрирована, схема данного эксперимента представлена на рисунке. В фибробластах мыши, являющейся моделью развития серповидно-клеточной анемии человека, мутантный аллель был заменен на нормальный с помощью гомологичной рекомбинации. Из «исправленных» фибробластов были получены ИПСК, которые затем были дифференцированы в предшественники клеток гематопозитического ряда. Гематопозитические предшественники затем были инъецированы в мышью, из кожи которой изначально были получены фибробласты (см. рисунок). В результате произошло значительное исправление изначального патологического фенотипа [86]. Подобный подход был применен на фибробластах и кератиноцитах человека, страдающего анемией Фанкони. Нормальный аллель мутантного гена, вызвавшего анемию, был введен в геном соматических кле-

ток с помощью лентивируса, затем из этих клеток были получены ИПСК. ИПСК, несущие здоровый аллель, были дифференцированы в гематопозитические клетки, сохраняющие нормальный фенотип [87]. Безусловно, использование лентивирусов невозможно при получении клеток, которые затем будут введены в организм человека, вследствие потенциальной онкогенности. Однако в настоящее время развиваются новые, относительно безопасные методы манипуляции с геномами, например, с использованием синтетических нуклеаз, содержащих домены «цинковые пальцы», которые дают возможность эффективно исправлять генетические дефекты *in vitro* [88].

Индуктированные плюрипотентные стволовые клетки являются прекрасной моделью для исследования патогенеза заболеваний на клеточном уровне и тестирования соединений, обладающих потенциальным лечебным эффектом.

Таблица. Линии ИПСК, полученные в результате репрограммирования соматических клеток пациентов с различными патологиями

Заболевание	Дефект, вызывающий развитие заболевания	Тип репрограммируемых клеток	Способ репрограммирования	Ссылка
Дефицит аденозин деаминазы	Замена GGG на AGG в 7-м экзоне, вызывающая замену аминокислот G216R, либо делеция GAAGA в экзоне 10 гена ADA (<i>Adenosine deaminase</i>)	Фибробласты кожи, кариотип 46, XY	Трансдукция ретровирусами, несущими кДНК генов OCT4, SOX2, KLF4 и c-MYC	[91]
Болезнь Гаучера, тип III	Замена AAC на AGC в экзоне 9 либо инсерция G в позиции 84 кДНК гена GBA (<i>β-acid glucosidase</i>)	Фибробласты кожи, кариотип 46, XY	Трансдукция ретровирусами, несущими кДНК генов OCT4, SOX2, KLF4 и c-MYC	[91]
Мышечная дистрофия Дюшена	Делеция экзонов 45–52 гена DMD (<i>Distrophin</i>)	Фибробласты кожи, кариотип 46, XY	Трансдукция ретровирусами, несущими кДНК генов OCT4, SOX2, KLF4 и c-MYC	[91]
Мышечная дистрофия Беккера	Неустановленная мутация в гене DMD	Фибробласты кожи, кариотип 46, XY	Трансдукция ретровирусами, несущими кДНК генов OCT4, SOX2, KLF4 и c-MYC	[91]
Синдром Дауна	Трисомия по 21-й паре хромосом	Фибробласты кожи, кариотип 47, XY	Трансдукция ретровирусами, несущими кДНК генов OCT4, SOX2, KLF4 и c-MYC	[91]
Болезнь Паркинсона	Мультифакториальное заболевание	Фибробласты кожи, кариотип 46, XY	Трансдукция ретровирусами, несущими кДНК генов OCT4, SOX2, KLF4 и c-MYC	[91]
		Фибробласты, возраст пациентов на момент биопсии 53–85 лет, кариотип шести линий 46, XY и одной 46, XX	Трансдукция лентивирусами, несущими гены OCT4, SOX2 и KLF4 либо OCT4, SOX2, KLF4 и c-MYC; LTR вирусов содержали сайты loxP, необходимые для вырезания экзогенной конструкции из генома клеток	[51]
Ювенильный сахарный диабет	Мультифакториальное заболевание	Фибробласты кожи, кариотип 46, XX	Трансдукция ретровирусами, несущими кДНК генов OCT4, SOX2, KLF4 и c-MYC	[91]
Синдром Швахмана-Бодиа-Даймонда	Точечные мутации в гене SBDS (<i>Shwachman-Bodian-Diamond syndrome</i>)	Мезенхимальные клетки костного мозга, кариотип 46, XY	Трансдукция ретровирусами, несущими кДНК генов OCT4, SOX2, KLF4 и c-MYC	[91]
Болезнь Хантингтона	Удлинение (CAG) _n триплетного повтора в гене <i>Huntingtin</i> от 37 до 100 мономеров (норма 11–34 мономера)	Фибробласты кожи, кариотип 46, XX	Трансдукция ретровирусами, несущими кДНК генов OCT4, SOX2, KLF4 и c-MYC	[91]
Синдром Леш-Нихана	Мутации гена HPRT (<i>Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase</i>)	Фибробласты кожи, кариотип 46, XX	Трансдукция ретровирусами, несущими кДНК генов OCT4, SOX2, KLF4 и c-MYC; одна линия получена в результате трансдукции доксициклинрегулируемых лентивирусных векторов, несущих кДНК генов OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC и NANOG	[91]
		Фибробласты, кариотип 46, XX	Трансдукция лентивирусами, несущими гены OCT4, SOX2 и KLF4, LTR вирусов содержали сайты loxP, необходимые для вырезания экзогенной конструкции из генома клеток	[51]
Врожденный дискератоз	Мутация гена DKC (<i>Dyskeratosis congenital</i>)	Фибробласты, кариотип 46, XX	Трансдукция лентивирусами, несущими гены OCT4, SOX2 и KLF4	[51]
Спинальная мышечная атрофия	Мутация гена SMN1 (<i>Survival motor neuron 1</i>), вызывающая понижение уровня белка SMN	Фибробласты кожи, кариотип 46, XY	Трансдукция лентивирусами, несущими кДНК генов OCT4, SOX2, NANOG и LIN28	[89]
Семейная дизавтономия	Мутация гена IKBKAP (<i>Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase complex-associated protein</i>), вызывающая нарушение сплайсинга его транскрипта (пропуск экзона 20)	Фибробласты кожи и легкого, кариотип 46, XX и 46, XY	Трансдукция лентивирусами, несущими кДНК генов OCT4, SOX2, KLF4 и c-MYC	[90]
β-Талассемия	Мутация гена HBB (<i>Haemoglobin beta</i>)	Фибробласты кожи, кариотип 46, XY	Трансдукция ретровирусами, несущими кДНК генов OCT4, SOX2, KLF4 и c-MYC	[92]
Диабет I типа	Мультифакториальное заболевание	Фибробласты кожи, кариотип 46, XY	Трансдукция ретровирусами, несущими кДНК генов OCT4, SOX2 и KLF4	[93]
Амиотрофный латеральный склероз	Замена L144F в белке супероксиддисмутазы, кодируемым доминантным аллелем гена SOD1 (<i>Superoxide dismutase1</i>), данная мутация ассоциирована с медленно прогрессирующей формой АЛС	Фибробласты кожи, кариотип 46, XX	Трансдукция ретровирусами, несущими кДНК генов OCT4, SOX2, KLF4 и c-MYC	[94]
Анемия Фанкони	Обнаружено 13 генов, мутации которых вызывают развитие анемии Фанкони	Фибробласты кожи и эпидермальные кератиноциты	Трансдукция ретровирусами, несущими кДНК генов OCT4, SOX2, KLF4 и c-MYC. Из кератиноцитов ИПСК получены без использования c-MYC	[87]

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки были получены из фибробластов пациента, страдающего спинальной мышечной атрофией (СМА) (СМА-ИПСК). СМА – это аутосомно-рецессивное заболевание, вызванное мутацией в гене (*SMN1*, *survival motor neuron 1*), выражающееся в избирательной нежизнеспособности нижних α -мотонейронов. Как правило, пациенты, страдающие этим заболеванием, умирают в возрасте около 2 лет. Существующие на настоящий момент экспериментальные модели данного заболевания, основанные на использовании плоских червей, дрозофил и мышей, несовершенны. Имеющиеся в распоряжении исследователей линии фибробластов пациентов, страдающих СМА, также не могут дать необходимых данных по патогенезу заболевания. Было показано, что из СМА-ИПСК могут быть получены моторные нейроны, сохраняющие признаки развития СМА, селективную гибель нейронов и отсутствие транскрипции гена *SMN1*. Более того, авторам удалось проследить повышение уровня экспрессии и агрегации белка SMN (кодируемого геном *SMN2*, экспрессия которого может компенсировать отсутствие белка *SMN1*) в ответ на обработку мотонейронов и астроцитов, полученных из СМА-ИПСК, вальпроевой кислотой и торбомицином [89]. То, что ИПСК и их производные могут быть объектом фармакологических исследований было показано на ИПСК больных семейной дизавтономией [90]. Семейная дизавтономия – это наследственное аутосомно-рецессивное заболевание, выражающееся в деградации сенсорных и автономных нейронов. В основе заболевания лежит мутация, вызывающая тканеспецифичное нарушение сплайсинга гена *IKBKAR*, что приводит к понижению уровня представленности полноразмерного белка *IKAR*. ИПСК были получены из фибробластов пациентов, страдающих семейной дизавтономией (СД). ИПСК обладали всеми характеристиками плюрипотентных клеток. Нейральные производные, полученные из данных клеток, имели признаки патогенеза СД, низкий уровень полноразмерного транскрипта *IKBKAR*. Авторы исследовали

влияние трех веществ: кинетина, эпигаллокатехингаллата и токоτριенола на параметры, связанные с патогенезом СД. Было показано, что только кинетин способен вызывать повышение уровня полноразмерного транскрипта *IKBKAR*. Продолжительная обработка кинетином вызывает повышение уровня дифференцировки нейронов и экспрессии маркеров периферических нейронов.

В настоящий момент получен довольно широкий спектр ИПСК пациентов с различными наследственными патологиями и мультифакторными заболеваниями, которые часто смертельны и с трудом поддаются классической терапии, таких, как болезнь Паркинсона, синдром Дауна, диабет I типа, мышечная дистрофия Дюшена, β -талассемия и другие [51, 87, 89, 91–94]. Данные о ИПСК, полученных в результате репрограммирования соматических клеток пациентов с различными патологиями, приведены в таблице.

Можно с уверенностью сказать, что ИПСК сами по себе и их производные являются мощным инструментом, который может найти применение в биомедицине, заместительной клеточной терапии, фармакологии, токсикологии. Однако для безопасного применения технологий, основанных на ИПСК, необходимо использование методов получения ИПСК и направленной дифференцировки, которые сводили бы к минимуму возможность появления мутаций в геномах клеток при культивировании *in vitro*, вероятность ракового перерождения клеток после инъекции. Требуется разработка методов культивирования ИПСК человека без применения клеток животных (например, фидерного слоя фибробластов мыши), чтобы исключить возможность переноса патогенов вирусного происхождения от животных человеку. Существует потребность в максимальной стандартизации условий культивирования и дифференцировки клеток. ●

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Smith A.G. // Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 2001. V. 17. P. 435–462.
- Boyer L.A., Lee T.I., Cole M.F., et al. // Cell. 2005. V. 122. P. 947–956.
- Loh Y.H., Wu Q., Chew J.L., et al. // Nat. Genet. 2006. V. 38. P. 431–440.
- Martin G.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. P. 7634–7638.
- Evans M.J., Kaufman M.H. // Nature. 1981. V. 292. P. 154–156.
- Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., et al. // Science. 1998. V. 282. P. 1145–1147.
- Hochedlinger K., Jaenisch R. // Nature. 2006. V. 441. P. 1061–1067.
- Takahashi K., Yamanaka S. // Cell. 2006. V. 126. P. 663–676.
- Aoi T., Yae K., Nakagawa M., et al. // Science. 2008. V. 321. P. 699–702.
- Eminli S., Utikal J., Arnold K., et al. // Stem Cells. 2008. V. 26. P. 2467–2474.
- Hanna J., Markoulaki S., Schorderet P., et al. // Cell. 2008. V. 133. P. 250–264.
- Kim J.B., Zaehres H., Wu G., et al. // Nature. 2008. V. 454. P. 646–650.
- Stadtfeld M., Brennand K., Hochedlinger K. // Curr. Biol. 2008. V. 18. P. 890–894.
- Wernig M., Meissner A., Foreman R., et al. // Nature. 2007. V. 448. P. 318–324.
- Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., et al. // Cell. 2007. V. 131. P. 861–872.
- Park I.H., Zhao R., West J.A., et al. // Nature. 2008. V. 451. P. 141–146.
- Lowry W.E., Richter L., Yachechko R., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. P. 2883–2888.
- Yu J., Vodyanik M.A., Smuga-Otto K., et al. // Science. 2007. V. 318. P. 1917–1920.
- Kang L., Wang J., Zhang Y., et al. // Cell Stem Cell. 2009. V. 5. P. 135–138.
- Zhao X.Y., Li W., Lv Z., et al. // Nature. 2009. V. 461. P. 86–90.
- Hotta A., Ellis J. // J. Cell Biochem. 2008. V. 105. P. 940–948.
- Okita K., Ichisaka T., Yamanaka S. // Nature. 2007. V. 448. P. 313–317.
- Carey B.W., Markoulaki S., Hanna J., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. P. 157–162.
- Ben-Porath I., Thomson M.W., Carey V.J., et al. // Nat. Genet. 2008. V. 40. P. 499–507.
- Hochedlinger K., Yamada Y., Beard C., Jaenisch R. // Cell. 2005. V. 121. P. 465–477.
- Park E.T., Gum J.R., Kakar S., et al. // Int. J. Cancer. 2008. V. 122. P. 1253–1260.
- Ghaleb A.M., Nandan M.O., Chanchevalap S., et al. // Cell Res. 2005. V. 15. P. 92–96.
- Kuttler F., Mai S. // Genome Dyn. 2006. V. 1. P. 171–190.
- Okita K., Nakagawa M., Hyenjong H., et al. // Science. 2008. V. 322. P. 949–953.

30. Duinsbergen D, Salvatori D, Eriksson M, Mikkers H. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2009. V. 1176. P. 197–204.
31. Feng B., Jiang J., Kraus P., et al. // *Nat. Cell. Biol.* 2009. V. 11. P. 197–203.
32. Nakagawa M., Koyanagi M., Tanabe K., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2008. V. 26. P. 101–106.
33. Wernig M., Meissner A., Cassady J.P., Jaenisch R. // *Cell Stem Cell.* 2008. V. 2. P. 10–12.
34. Kim J.B., Sebastiano V., Wu G., et al. // *Cell.* 2009. V. 136. P. 411–419.
35. Kim J.B., Greber B., Arauzo-Bravo M.J., et al. // *Nature.* 2009. V. 461. P. 649–643.
36. Utikal J., Maherali N., Kulalert W., Hochedlinger K. // *J. Cell Sci.* 2009. V. 122. P. 3502–3510.
37. Sun N., Panetta N.J., Gupta D.M., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. P. 15720–15725.
38. Aasen T., Raya A., Barrero M.J., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2008. V. 26. P. 1276–1284.
39. Tsai S.Y., Clavel C., Kim S., et al. // *Stem Cells.* 2010. V. 28. P. 221–228.
40. Shi Y., Despons C., Do J.T., et al. // *Cell Stem Cell.* 2008. V. 3. P. 568–574.
41. Shi Y., Do J.T., Despons C., et al. // *Cell Stem Cell.* 2008. V. 2. P. 525–528.
42. Huangfu D., Maehr R., Guo W., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2008. V. 26. P. 795–797.
43. Huangfu D., Osafune K., Maehr R., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2008. V. 26. P. 1269–1275.
44. Silva J., Barrandon O., Nichols J., et al. // *PLoS Biol.* 2008. V. 6. P. e253.
45. Esteban M.A., Wang T., Qin B., et al. // *Cell Stem Cell.* 2010. V. 6. P. 71–79.
46. Hong H., Takahashi K., Ichisaka T., et al. // *Nature.* 2009. V. 460. P. 1132–1135.
47. Utikal J., Polo J.M., Stadtfeld M., et al. // *Nature.* 2009. V. 460. P. 1145–1148.
48. Marion R.M., Strati K., Li H., et al. // *Nature.* 2009. V. 460. P. 1149–1153.
49. Li H., Collado M., Villasante A., et al. // *Nature.* 2009. V. 460. P. 1136–1139.
50. Kawamura T., Suzuki J., Wang Y.V., et al. // *Nature.* 2009. V. 460. P. 1140–1144.
51. Soldner F., Hockemeyer D., Beard C., et al. // *Cell.* 2009. V. 136. P. 964–977.
52. Kaji K., Norrby K., Paca A., et al. // *Nature.* 2009. V. 458. P. 771–775.
53. Shao L., Feng W., Sun Y., et al. // *Cell Res.* 2009. V. 19. P. 296–306.
54. Sommer C.A., Stadtfeld M., Murphy G.J., et al. // *Stem Cells.* 2009. V. 27. P. 543–549.
55. Yu J., Hu K., Smuga-Otto K., et al. // *Science.* 2009. V. 324. P. 797–801.
56. Nanbo A., Sugden A., Sugden B. // *EMBO J.* 2007. V. 26. P. 4252–4262.
57. Hahn W.C., Counter C.M., Lundberg A.S., et al. // *Nature.* 1999. V. 400. P. 464–468.
58. Woltjen K., Michael I.P., Mohseni P., et al. // *Nature.* 2009. V. 458. P. 766–770.
59. Yusa K., Rad R., Takeda J., Bradley A. // *Nat. Methods.* 2009. V. 6. P. 363–369.
60. Elick T.A., Bauser C.A., Fraser M.J. // *Genetica.* 1996. V. 98. P. 33–41.
61. Stadtfeld M., Nagaya M., Utikal J., et al. // *Science.* 2008. V. 322. P. 945–949.
62. Zhou W., Freed C.R. // *Stem Cells.* 2009. V. 27. P. 2667–2674.
63. Fusaki N., Ban H., Nishiyama A., et al. // *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* 2009. V. 85. P. 348–362.
64. Kim D., Kim C.H., Moon J.I., et al. // *Cell Stem Cell.* 2009. V. 4. P. 472–476.
65. Zhou H., Wu S., Joo J.Y., et al. // *Cell Stem Cell.* 2009. V. 4. P. 381–384.
66. Murry C.E., Keller G. // *Cell.* 2008. V. 132. P. 661–680.
67. Rideout W.M., 3rd, Hochedlinger K., Kyba M., et al. // *Cell.* 2002. V. 109. P. 17–27.
68. Lamba D.A., Gust J., Reh T.A. // *Cell Stem Cell.* 2009. V. 4. P. 73–79.
69. Yang D., Zhang Z.J., Oldenburg M., et al. // *Stem Cells.* 2008. V. 26. P. 55–63.
70. Kim J.H., Auerbach J.M., Rodriguez-Gomez J.A., et al. // *Nature.* 2002. V. 418. P. 50–56.
71. Karumbayaram S., Novitch B.G., Patterson M., et al. // *Stem Cells.* 2009. V. 27. P. 806–811.
72. Chambers S.M., Fasano C.A., Papapetrou E.P., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2009. V. 27. P. 275–280.
73. Hirami Y., Vugler A.A., Hikita S.T., et al. // *PLoS One.* 2009. V. 4. P. e8152.
74. Meyer J.S., Shearer R.L., Capowski E.E., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. P. 16698–16703.
75. Hirami Y., Osakada F., Takahashi K., et al. // *Neurosci. Lett.* 2009. V. 458. P. 126–131.
76. Buchholz D.E., Hikita S.T., Rowland T.J., et al. // *Stem Cells.* 2009. V. 27. P. 2427–2434.
77. Nelson T.J., Martinez-Fernandez A., Yamada S., et al. // *Circulation.* 2009. V. 120. P. 408–416.
78. Tanaka T., Tohyama S., Murata M., et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009. V. 385. P. 497–502.
79. Kuzmenkin A., Liang H., Xu G., et al. // *FASEB J.* 2009. V. 23. P. 4168–4180.
80. Mauritz C., Schwanke K., Reppel M., et al. // *Circulation.* 2008. V. 118. P. 507–517.
81. Gai H., Leung E.L., Costantino P.D., et al. // *Cell. Biol. Int.* 2009. V. 33. P. 1184–1193.
82. Song Z., Cai J., Liu Y., et al. // *Cell Res.* 2009. V. 19. P. 1233–1242.
83. Senju S., Haruta M., Matsunaga Y., et al. // *Stem Cells.* 2009. V. 27. P. 1021–1031.
84. Tateishi K., He J., Taranova O., et al. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. P. 31601–31607.
85. Choi K.D., Yu J., Smuga-Otto K., et al. // *Stem Cells.* 2009. V. 27. P. 559–567.
86. Hanna J., Wernig M., Markoulaki S., et al. // *Science.* 2007. V. 318. P. 1920–1923.
87. Raya A., Rodriguez-Piza I., Guenechea G., et al. // *Nature.* 2009. V. 460. P. 53–59.
88. Zou J., Maeder M.L., Mali P., et al. // *Cell Stem Cell.* 2009. V. 5. P. 97–110.
89. Ebert A.D., Yu J., Rose F.F., Jr., et al. // *Nature.* 2009. V. 457. P. 277–280.
90. Lee G., Papapetrou E.P., Kim H., et al. // *Nature.* 2009. V. 461. P. 402–406.
91. Park I.H., Arora N., Huo H., et al. // *Cell.* 2008. V. 134. P. 877–886.
92. Wang Y., Jiang Y., Liu S., et al. // *Cell Res.* 2009. V. 19. P. 1120–1123.
93. Maehr R., Chen S., Snitow M., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. P. 15768–15773.
94. Dimos J.T., Rodolfa K.T., Niakan K.K., et al. // *Science.* 2008. V. 321. P. 1218–1221.

УДК 577.1.577.12.577.114

Биогликаны и природные гликозиды как перспективные объекты биоорганической химии

Ю. С. Оводов

Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения РАН, 167982, Сыктывкар, ул. Первомайская, 50

E-mail: ovoys@physiol.komisc.ru

Поступила в редакцию 18.03.2010 г.

РЕФЕРАТ В обзоре дается определение биоорганической химии как одной из важнейших составляющих физико-химической биологии, которая является основополагающей наукой о механизмах жизненных процессов. На сравнительно небольшом числе примеров рассмотрены задачи и проблемы биоорганической химии, приведены достижения в решении проблем, связанных с изучением химического строения, биологической функции и физиологической активности биополимеров и низкомолекулярных биорегуляторов, с выяснением молекулярных механизмов функционирования живых организмов.

Наряду с общими достижениями биоорганической химии, в обзоре кратко рассмотрены результаты работ автора в данной области в Тихоокеанском институте биоорганической химии ДВО РАН (ТИБОХ), в Институте физиологии Коми НЦ УрО РАН (ИФ), в которых автор проработал в течение достаточно длительного времени и имел честь возглавлять одну из научных школ по биоорганической химии и молекулярной иммунологии. В статье приводятся наиболее яркие с его точки зрения достижения биоорганической химии и особое внимание уделяется всестороннему изучению углеводсодержащих биополимеров (биогликанов) и некоторых типов природных гликозидов, чему автор посвятил основную часть своей научной деятельности.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА биогликаны, природные гликозиды, низкомолекулярные биорегуляторы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ЛПС – липополисахариды, PSA – простато-специфический антиген, ЛПБК – липополисахарид-белковый комплекс, РЭА – раково-эмбриональный антиген, РПЖ – рак предстательной железы.

ВВЕДЕНИЕ

Биоорганическая химия изучает химическое строение биополимеров и низкомолекулярных биорегуляторов, а также их биологическую активность, включающую биологические функции, выполняемые природными соединениями в организме, и физиологическую активность, которой обладает выделенное из данного источника соединение в отношении человека и других организмов. Как свидетельствуют Н.Е. Спиченкова и В.Е. Васильковский [1], термин «биоорганическая химия» впервые появился в печати в 1967 г. в статье М.М. Шемякина и А.С. Хохлова [2]. Все стороны биоорганической химии обстоятельно рассмотрены Ю.А. Овчинниковым в монументальном труде [3], который стал классическим и широко используется специалистами в данной области исследований.

Начиная с середины прошлого столетия пристальное внимание химиков-биооргаников привлекают морские организмы [4–6], включая водоросли, морские животные и микроорганизмы. Многие из морских организмов являются источниками необычных вторичных метаболитов, которые обладают своеобразным строением и уникальными свойствами [7]. Изучение полисахаридов морских водорослей началось еще в позапрошлом столетии и успешно продолжается вплоть до настоящего времени [8].

Биоорганическая химия играет выдающуюся роль в создании лекарственных средств, биологически активных пищевых добавок, в развитии фармацевтической химии и медицины. Она возникла на базе химии природных соединений, истоки которой лежат в народной медицине, которая существует многие тысячелетия и служит путеводителем при выборе биологических объектов в качестве источников ценных биопрепаратов, активных пищевых добавок и лекарственных средств. Очень обстоятельная информация о различных типах низкомолекулярных биорегуляторов совсем недавно приведена в прекрасных работах иркутских ученых [9–11]. В историческом аспекте хочется отметить экстракты женьшеня и трепанга, издавна применяющиеся в китайской народной медицине в качестве активных биостимуляторов. Структурное изучение [4] показало, что оба источника содержат близкие классы низкомолекулярных биорегуляторов в качестве действующих начал, представляющие собой тритерпеновые гликозиды, но лишенные углеводной составляющей (агликоны, или генины). Подобные же соединения обнаружены в листьях березы и ольхи, которые в ряде случаев служат исходным сырьем для синтетического получения действующих начал женьшеня *Panax ginseng* С.А. Меу, его гликозидов (панаксозидов) (рис. 1).

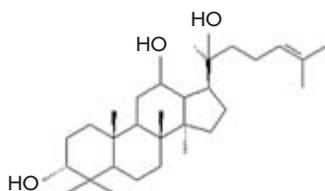


Рис. 1. Бетулафолиентриол из листьев березы или ольхи – один из генинов панаксозидов, тритерпеновых гликозидов женьшеня.

Для проявления ими физиологической активности необходимо обязательное наличие углеводной компоненты (гликона), которая в данном случае представлена олигосахаридами, сравнительно короткими углеводными цепями.

ПОЛИСАХАРИДЫ РАСТЕНИЙ И ГРИБОВ

Как известно, в состав растений входят полисахариды, имеющие длинные углеводные цепи, линейные или разветвленные. Полисахариды составляют основу растительной клетки, их содержание нередко достигает 80%. В растениях они выполняют самые разнообразные функции, многие из них обладают выраженной физиологической активностью. В этом отношении особый интерес представляют полисахариды, содержащие в своей структуре остатки гликуроновых кислот, главным образом *D*-галактурановой и *D*-глюкуроновой, и относящиеся к таким классам растительных полисахаридов, как пектиновые вещества, камеди и слизи [12, 13]. В состав альгиновой кислоты, основного полисахарида морских бурых водорослей, входят остатки *D*-маннурановой и *L*-гулурановой кислот [14].

В течение длительного времени особое внимание исследователей привлекают пектиновые вещества как составная часть так называемых пищевых волокон растений и как биополимеры, обладающие высокой и многоплановой биологической активностью [15]. Их главная углеводная цепь построена из 1,4-связанных остатков α -*D*-галактурановой кислоты. Линейные участки этой цепи связываются между собой остатками *L*-рамнозы, включенными в состав цепи 1,2- α -гликозидными связями. К остаткам рамнозы присоединяются различной длины боковые цепи, построенные, главным образом, из остатков арабинозы и галактозы. В настоящее время пектиновые вещества рассматривают как очень сложный полисахаридный комплекс, составляющий основу растительной клетки и включающий протопектин, нерастворимый пектиновый комплекс с целлюлозой и гемицеллюлозой; пектиновые полисахариды нерегулярного строения и сопутствующие им разветвленные полисахариды: арабинаны, галактаны, арабиногалактаны (рис. 2) [16].

Общая схема строения пектиновых полисахаридов представлена на рис. 3 [16, 17].

Показано, что пектиновые полисахариды обладают широким спектром физиологической активности [17–19]. В этом отношении следует прежде всего отметить их иммуномодулирующее действие (стимуляция фагоцитоза), ярко выраженное антигистаминное действие и антидотную активность – способность выводить из организма соли тяжелых металлов, органические токсины и яды. Не случайно в горячих цехах, на химических производствах нередко



Рис. 2. Составляющие компоненты пектиновых веществ.

рядом с молоком выдают пектины в качестве антидотного профилактического средства. Очень благотворно влияют на организм человека пектины из яблок. Считается, что регулярное потребление яблок (по одному утром и вечером) увеличивает в среднем продолжительность жизни на 10 лет. Еще полезнее регулярное употребление в пищу яблочного джема, где относительное содержание пектина значительно выше, чем в свежих яблоках. Галактурананы, лишенные боковых цепей, обладают выраженной противовоспалительной активностью [20].

В качестве источника других физиологически активных полисахаридов следует отметить некоторые грибы. Наибольшее внимание исследователей привлекли лентинан и пахимаран. Лентинан был впервые выделен японскими исследователями во главе с Г. Чихара в 1969 г. [21] из съедобного гриба *Lentinus edodes*, распространенного в тихоокеанском регионе и популярного в Японии. Второй активный глюкан грибов, известный как пахиман, был выделен из гриба *Poria cocos* [22, 23], при мягком периодатном окислении пахимана был получен более активный пахимаран. Кроме того, из этого же гриба была получена еще целая серия физиологически активных 1,3- β -*D*-глюканов [24, 25]. Лентинан и пахимаран относятся к группе 1,3- β -, 1,6- β -*D*-глюканов, их основная углеводная цепь построена из остатков *D*-глюкопиранозы, связанных β -1,3-гликозидной связью, боковые цепи из 1,3-связанных остатков β -*D*-

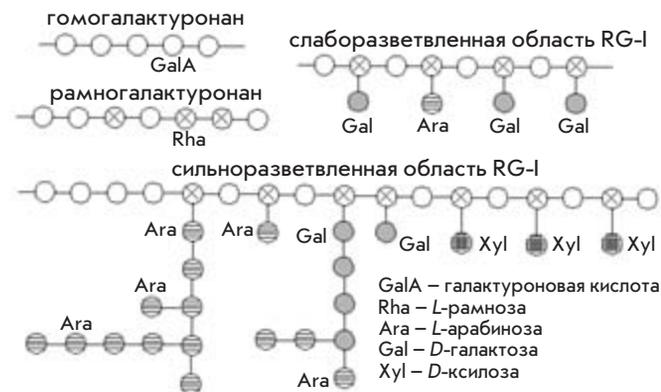


Рис. 3. Общая схема строения пектиновых полисахаридов.

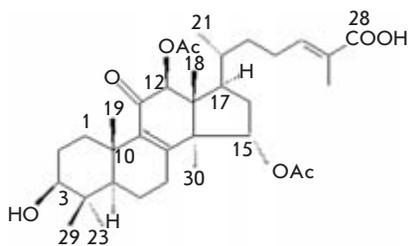


Рис. 4. Ганодермовая кислота – тритерпен ланостанового ряда *G. lucidum*, *G. applanatum*.

глюкопиранозы присоединены к основной углеводной цепи β -1,6-гликозидной связью [21–26].

Оба полисахарида обладают высокой противоопухолевой активностью, которая, как убедительно показали Г. Чихара и другие японские исследователи, непосредственно связана с их иммуномодулирующим действием на иммунную систему организма-опухоленосителя [21, 27, 28].

Так, лентинан вызывает практически полное торможение роста ряда экспериментальных опухолей, таких, как саркома Гаусса, карцинома Эрлиха и др. Его противоопухолевая активность обусловлена стимуляцией Т-лимфоцитов-киллеров, в то время как никакого заметного влияния на В-лимфоциты и, следовательно, на образование антител (гуморальный ответ) не наблюдается. Очень существенным фактором в проявлении иммуномодулирующей активности глюканами грибов является их высокая молекулярная масса (около 1 МДа). Частичное удаление боковых цепей без значительного снижения мол. массы особого влияния на иммуномодулирующую активность не оказывает, а в случае пахимана и превращения его в пахимаран отмечается заметное усиление физиологической активности [27].

Лентинан нашел широкое применение в медицинской практике в качестве эффективного средства при профилактике и лечении целого ряда злокачественных новообразований.

В качестве источника 1,3- β -D-глюканов получили широкое признание грибы различных видов рода *Ganoderma*, в первую очередь гриб *G. lucidum*, который применяется в народной медицине Японии и Китая [29, 30]. В последние годы было проведено обстоятельное исследование грибов этого рода [30–35]. Одним из основных компонентов, входящих в состав этого гриба, является 1,3- β -D-глюкан [35], который обладает иммуностимулирующей активностью, в первую очередь, усиливает фагоцитоз и увеличивает продуцирование интерлейкина-1 (IL-1). Кроме того, растет продуцирование интерферона IFN- γ , интенсивного иммуномодулятора [36]. В этой связи экстракты гриба нашли применение при лечении ослабленной иммунной системы, язв желудочно-кишечного тракта, при онкозаболеваниях. В частности, препараты на основе сухого порошка *G. lucidum* дают хорошие результаты при лечении сарком [37].

Кроме того, в различных видах данного гриба обнаружены, выделены и изучены тритерпеноиды ланостанового ряда [38, 39], в частности ганодермовая кислота (рис. 4), присутствие которой в водно-этанольном экстракте обуславливает еще ряд видов физиологической активности. Выпускаемый в Китае на основе *G. lucidum* препарат Ling-Zhi (водно-этанольный экстракт) дает хорошие результа-

ты при лечении нервных болезней, при бессоннице и головокружениях. Применяется он также при лечении астмы и при других аллергических проявлениях [39].

В последние годы получены обширные данные о структуре и физиологической активности 1,3- β -D-глюканов из целого ряда природных грибов [40–43].

БИОГЛИКАНЫ МОРСКИХ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ

Еще одну большую группу иммуномодуляторов составляют биогликаны морских беспозвоночных. Они представляют собой углевод-белковые биополимеры, в которых углеводная составляющая представлена разветвленным D-глюканом, а с ним достаточно прочной, но не ковалентной связью соединена белковая компонента, относящаяся к классу лектинов, специфически связывающихся с полисахаридами. Для проявления иммуномодулирующей активности необходимо наличие обеих составляющих биогликана [44, 45].

Нами [45] было проведено систематическое изучение большого числа различных морских беспозвоночных и обнаружено наличие практически во всех из них биогликанов-иммуномодуляторов. На основании полученных результатов был сделан вывод, что морские беспозвоночные продуцируют биогликан-иммуномодуляторы, которые обуславливают их хорошо известную устойчивость к возникновению злокачественных новообразований [45].

Наиболее обстоятельно был изучен митилан, биогликан-иммуномодулятор, выделенный из различных видов широко распространенных в морях мидий семейства *Mytilidae*: *Crenomytilus grayanus*, *Mytilus edulis*, *M. galloprovinciales* [44, 45]. Митилан значительно усиливает фагоцитарную активность и гуморальные факторы иммунитета. Получают его из так называемого мидийного сока, который ранее был отбросом при приготовлении из мидий пищевого продукта [6, 44, 45].

Особенно интересным оказалось свойство митилана усиливать иммунный ответ при гриппозной инфекции. Он получил широкое применение как препарат для профилактики и лечения гриппа, особенно на ранних стадиях болезни. Противовирусное действие митилана связано с его способностью усиливать биосинтез эндогенного интерферона, играющего определяющую роль в борьбе организма с вирусными инфекциями. Интересно также отметить, что средняя продолжительность жизни экспериментальных животных при этом возрастает вдвое [6, 45].

ЛИПОПОЛИСАХАРИДЫ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

Начиная с середины 30-х годов прошлого столетия пристальное внимание исследователей было приковано к изучению структуры и физиологической активности антигенов грамотрицательных бактерий, так называемых O-соматических антигенов, представляющих собой липополисахариды (ЛПС) [46].

Вначале французские ученые А. Буавен и Л. Месробену [47] выделили иммуноген, который до настоящего времени так и называют “антиген Буавена” и который представляет собой липополисахарид-белковый комплекс (ЛПБК) [48]. В дальнейшем огромное число работ было посвящено изучению структуры и свойств ЛПС, которые являются не только O-соматическими антигенами грамотрицатель-

ных бактерий, но и очень активными эндотоксинами [49]. Было установлено, что ЛПС состоят из трех основных областей, связанных друг с другом:

Липид А – Кор макромолекулы – О-специфический полисахарид.

Огромный вклад в изучение строения и свойств ЛПС внесла немецкая школа Вестфалья-Людерица, работающая во Фрайбурге (ФРГ) с начала 50-х годов прошлого столетия. С конца 60-х годов работы по изучению структуры и свойств проводят многочисленные исследователи. Нами [50] в ТИБОХ эти исследования были начаты в 1970 г. с изучения антигенного состава псевдотуберкулезного микроба, вызывающего на Дальнем Востоке (в Приморском крае) специфическое заболевание – дальневосточную скарлатиноподобную лихорадку. Исследования ЛПС продолжают широким фронтом и в настоящее время. Наибольшую известность получили работы школы Н.К. Кочеткова [51] и, в частности, его интенсивно работающего ученика Ю.А. Книреля [52].

В результате было установлено строение большого числа ЛПС из самых различных грамотрицательных бактерий. При этом было показано, что липид А обуславливает эндотоксические свойства ЛПС, т.е. именно с ним связаны основные симптомы того или иного заболевания. Характер иммунного ответа на данное заболевание определяется О-специфическим полисахаридом, который и является матрицей для продуцирования и определения характера антител, т.е. обуславливает иммунный ответ организма, возникающий в результате заболевания. О-Специфические полисахариды характеризуются большим разнообразием структур. В их составе были обнаружены остатки многих необычных моносахаридов, которые зачастую находятся на невосстанавливающих, терминальных концах макромолекулы и определяют ее серологическую специфичность, т.е. являются иммунодетерминантами, или иммунодоминантными сахарами [51–53].

Использовать ЛПС для лечебных целей, как правило, не удастся из-за их высокой токсичности и, следовательно, низкого терапевтического индекса, однако на их основе разработано большое число диагностических средств, позволяющих диагностировать заболевания на самых ранних стадиях. Кроме того, О-специфические полисахариды нередко обладают иммуноадьювантными свойствами, т.е. способностью усиливать действие вакцин против данного заболевания [52, 54].

В этой связи очень перспективными оказались ЛПС сине-зеленых водорослей, представляющих большой класс цианобактерий. Эти ЛПС характеризуются отсутствием токсичности, но в то же время обладают выраженными иммуноадьювантными свойствами. На их основе нами был разработан очень эффективный адьювант, который к тому же лишен целого ряда побочных действий, присутствующих классическим адьювантам, таким, как адьювант Фрейнда, нередко вызывающий образование абсцессов в месте введения [55].

ОНКОФЕТАЛЬНЫЕ АНТИГЕНЫ

Значительный интерес представляют онкофетальные антигены [56, 57], которые были открыты нашими соотечествен-

никами Ю.С. Татариновым и Г.И. Абелевым в начале 60-х годов прошлого столетия [58–61]. Они появляются в организме человека в период внутриутробного развития, делая организм невосприимчивым (толерантным) по отношению к этим антигенам. Затем они исчезают и возникают в организме человека в процессе развития онкозаболевания: этим способом раковая клетка маскируется от действия иммунной системы организма хозяина, который не признает ее за чужеродную. Таким образом, онкофетальные антигены являются важными маркерами злокачественных новообразований (неоплазм) и используются для их выявления на ранних стадиях заболевания [44, 62, 63].

В этом отношении значительный интерес представляет так называемый раково-эмбриональный антиген (РЭА) [63, 64], который не отличается высокой специфичностью. В биологических жидкостях здоровых людей он не обнаруживается. Его появление в крови пациента и рост концентрации (более 5 нг/мл) может служить серьезным указанием на наличие в организме практически любого онкозаболевания, в частности новообразований пищеварительного тракта, дыхательной системы, карциномы молочной железы, головы, шеи [63]. Как и все онкофетальные антигены, он представляет собой очень сложный гликопротеин, в котором белковая часть играет определяющую роль. При изучении его пространственной структуры нами было показано, что углеводная составляющая является стабилизатором конформации РЭА [64, 65].

Следует отметить, что многие онкофетальные антигены обладают достаточно высокой, хотя и не абсолютной специфичностью. Среди них PSA – простато-специфический антиген, один из основных маркеров рака предстательной железы – аденокарциномы (РПЖ) [66]. РПЖ – это гормон-зависимая на начальных стадиях (андроген-зависимая) опухоль у мужчин [67–70], которая имеет достаточно широкое распространение (второе место по частоте после рака легких), позднее она переходит в андроген-независимую метастазирующую стадию. Смертность в основном обусловлена метастазами в костные ткани и лимфатические узлы, а также переходом в андроген-независимую стадию роста опухоли, что усложняет процесс ее лечения. Какое-либо эффективное лечение РПЖ с метастазами в настоящее время отсутствует. Заболевание особенно распространено среди мужчин США. Так, по официальным данным в 1999 г. болезнь унесла жизни более 37 тысяч американских мужчин, в 2005 г. – более 30 тысяч. Изучению этого заболевания в США уделяется особое внимание. Для диагностики наиболее широко применяется определение уровня PSA в крови. Хотя этот тест часто дает ложно-положительные результаты, он точно определяет степень риска. PSA представляет собой одноцепочечный гликопротеин, содержащий 240 а.о. и имеющий мол. массу 33–34 кДа [66]. Есть еще ряд маркеров РПЖ, тем не менее установление точного диагноза является непростой задачей, хотя в последнее время предложено несколько современных методов определения PSA в крови [71–73].

Лечение РПЖ включает прежде всего резкое увеличение физической активности, что играет важную роль в нормализации всех процессов метаболизма, протекающих в организме, и обуславливает ликвидацию застойных явлений [69, 71]. Медикаментозное лечение основано на при-

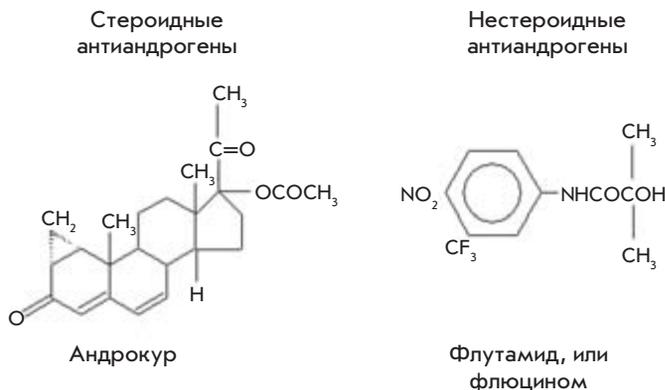


Рис. 5. Ингибиторы превращения тестостерона в дигидропроизводное.

менении антиандрогенов (рис. 5), которые ингибируют превращение тестостерона в дигидротестостерон, что важно на первой андроген-зависимой стадии болезни, а также на использовании антиоксидантов и противовоспалительных средств [66, 74–79].

В стратегии лечения любых опухолей, включая РПЖ, широко применяют антиоксиданты. Опухолевая клетка отличается повышенным потреблением кислорода, поэтому антиоксиданты эффективно блокируют развитие опухолей (рис. 6, 7), в том числе апигенин – активный компонент зеленого чая.

Высокой противоопухолевой активностью обладает ликопин (рис. 7), липофильный углеводород, который, как показало изучение его структуры, имеет линейную углеводородную цепь из 40 углеродных атомов и содержит 11 сопряженных и 2 несопряженные двойные связи [80]. В виде *транс*-формы ликопин содержится в свежих помидорах, но в процессе их переработки он переходит в *цис*-форму. Биологическая доступность для человека ликопина из томатной пасты в 2.5 раза выше, чем из свежих помидоров. Потребление помидоров снижает риск РПЖ на 20%, а использование в пищу томатного соуса и томатной пасты уменьшает риск рака простаты на 66%. В этой связи употребление в пищу продуктов, содержащих помидоры в любом виде, очень способствует снижению риска рака предстательной железы. При этом одновременно снижается риск рака желудочно-кишечного тракта, рака легких и молочной железы [80].

Показано, что ликопин является антиоксидантом и обладает высоким протективным эффектом в отношении перекисного окисления липидов и окислительного распада ДНК, что и обуславливает его протективную роль в отношении опухолей [81]. В медицине он применяется в составе биологически активных добавок: ликопрофит и ликолам.

Таким образом, существует очень большое число препаратов, применяемых для лечения онкозаболеваний. Многие из них предложены специалистами, работающими в области биоорганической химии. Тем не менее при всем обилии препаратов очень важно желание больного сопротивляться болезни, выздороветь, иметь постоянно положительный настрой, вести активный образ жизни, что способствует нормализации процессов метаболизма и повышению иммунитета, основного фактора борьбы с онкозаболеваниями.

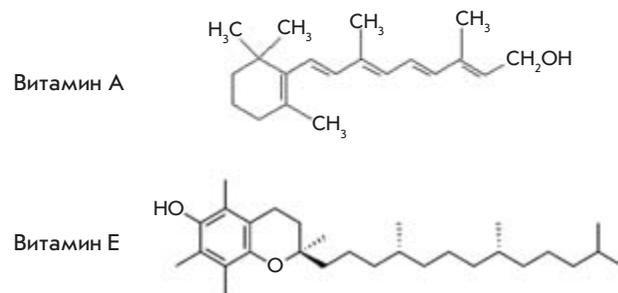


Рис. 6. Витамины А (ретинол) и Е (α-токоферол) – мощные антиоксиданты. Используются в терапии онкозаболеваний.

АКТИВНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ЧЕСНОКА

Очень интересные вещества с разным характером физиологического действия входят в состав чеснока *Allium sativum* L. (рис. 8) [82]. Чеснок в среднем содержит около 2% аллиина, который представляет собой сульфоксид *S*(+)-алкил-*L*-цистеина и обладает выраженным физиологическим действием в отношении язвенной болезни желудка,

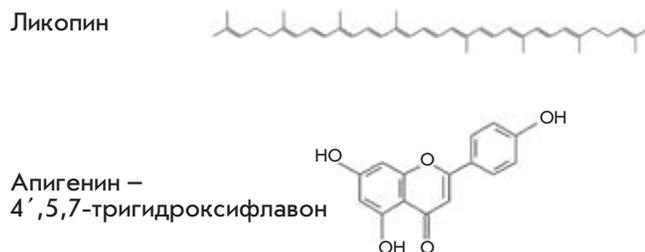


Рис. 7. Антиоксиданты для лечения онкозаболеваний.

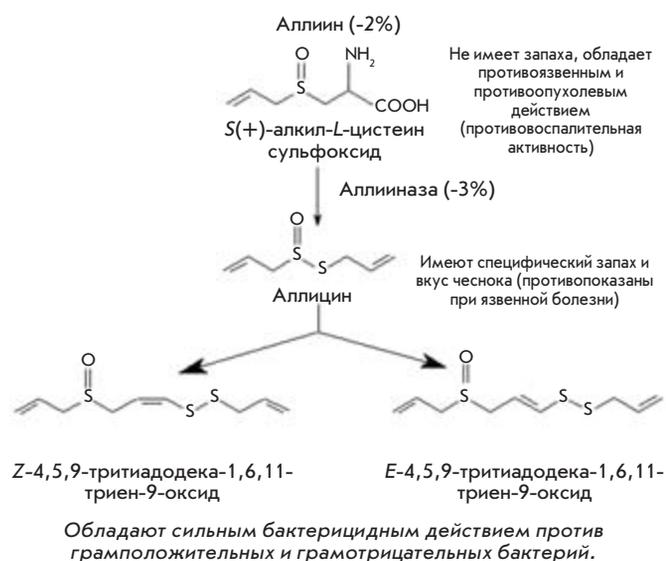


Рис. 8. Активные компоненты чеснока *Allium sativum* L.

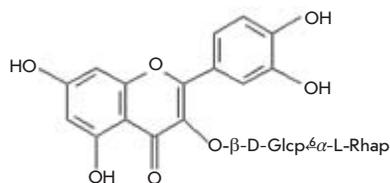


Рис. 9. Рутин (витамин Р) – рутинозид кверцетина.

полезен он и при лечении онкозаболеваний благодаря противовоспалительной активности.

Однако, как показали японские исследователи [83], в составе чеснока содержится около 3% высокоактивного фермента аллииназы, которая очень сильно активизируется в присутствии кислорода воздуха. Поэтому при измельчении головок чеснока наблюдается быстрый ферментолитический распад аллиина с образованием аллицина и других сернистых соединений, которые обуславливают специфический запах и вкус чеснока, обладают сильными бактерицидными свойствами в отношении как грамположительных (в том числе *Staphylococcus aureus*), так и грамотрицательных (например, *Salmonella* sp.) микроорганизмов, но сильно раздражают слизистые оболочки и противопоказаны при язвенной болезни желудка [83]. Найдено также, что сернистые соединения чеснока благодаря их высокой антиоксидантной активности и способности стимулировать иммунные ответы снижают индукцию рака ряда органов канцерогенами [84].

ФЛАВОНОИДЫ И АЛКАЛОИДЫ

Большой класс активных природных соединений составляют флавоноиды, которые чрезвычайно широко распространены в растительном мире. Они представляют собой самые разнообразные производные хромана и изохромана, встречаются в природе в виде гликозидов и агликонов [9–11].

В качестве примера приведем биозид кверцетина (рис. 9), который получил название рутин от растения руты, из которого он впервые был выделен [9, 10]. А входящий в его состав дисахарид называют рутинозой. Сырьем для получения рутина служат листья гречихи. Рутин относится к числу витаминов группы Р. Его функция в организме млекопитающих состоит в укрепляющем действии на кровеносные капилляры и в увеличении свертывающей способности крови. Эффект рутина усиливается в присутствии витамина С. Рутин находит практическое применение при лечении заболеваний, связанных с кровоизлияниями, происходящими из-за повышенной ломкости капилляров и дефектов свертывающей системы крови. Такой тип физиологического действия характерен для многих флавоноидов, которые в той или иной мере обладают Р-витаминной активностью.

Кроме того, флавоноиды являются мощными антиоксидантами и способны связывать свободные радикалы, повреждающие клеточные стенки нормальных клеток.

Из других низкомолекулярных биорегуляторов упомянем только алкалоиды [3], представляющие собой разнообразные высокоактивные азотсодержащие соединения. Многие из них являются сильными наркотиками и анальгетиками, в частности, один из наиболее известных алкалоидов – морфин (рис. 10), основной алкалоид мака *Papaver somniferum* [3, 85]. Химики-биоорганики не только уста-

новили строение этого сложнейшего природного соединения, но и осуществили его блестящий синтез. Аймалин и аллопинин – алкалоиды с мощным антиаритмическим действием.

ЯДЫ И ТОКСИНЫ

Наибольшей физиологической активностью обладают яды и токсины, которые в сравнительно невысоких дозах приводят к гибели организма. Эти термины близки по значению. Но под термином «яд» подразумевают любое токсичное вещество независимо от происхождения, например цианистый калий, мышьяк и яд кобры, тогда как под термином «токсины» подразумеваются яды биологического происхождения [3].

Яды и токсины – вещества высочайшей физиологической активности и исключительной селективности. Наиболее токсичным из ядов и токсинов является ботулинотоксин, белковый токсин анаэробного микроорганизма *Clostridium botulinum* [3, 86]. Столь же высокой токсичностью обладают и токсины других клостридий. Летальная доза ботулинотоксина составляет 10^{-5} мкг/кг, тогда как токсичность цианистого калия равна 10^4 мкг/кг. Ботулинотоксин продуцируется клостридиями в строго анаэробных условиях и является мощным нейротоксином, блокирующим передачу нервных импульсов, что приводит к параличу и к летальному исходу. К ботулинотоксину наиболее чувствительны люди и все виды домашних животных. Поражение человека ботулизмом наблюдается чаще всего при употреблении в пищу плохо законсервированных продуктов: мяса, рыбы и особенно часто – пластинчатых грибов. На пластинах плохо очищенных грибов хорошо сохраняются споры клостридий, устойчивые к довольно жестким условиям стерилизации. При домашнем консервировании часто не соблюдаются условия стерилизации, что приводит к сохранению спор клостридий, которые хорошо размножаются в отсутствие кислорода и дают активные формы, продуценты ботулинотоксина. Заболевание ботулизмом протекает очень тяжело и может привести к смертельному исходу. Вот почему не рекомендуется покупать консервированные в банках грибы на рынках, не употреблять в пищу непроваренные консервы. Даже грибные консервы собственного приготовления рекомендуется прокипятить перед употреблением, такая обработка приводит к разрушению ботулинотоксина, если он образовался в консервах. Хорошие результаты в лечении ботулизма дает применение анатоксина, т.е. токсина, предварительно обработанного формалином, или использование сыворотки к анатоксину, что оказывается достаточно эффективным на всех стадиях развития болезни.

Другими очень мощными токсинами белкового происхождения являются циклопептидные токсины бледной поганки *Amanita phalloides* [3, 76]: аманитин и фаллоидин,

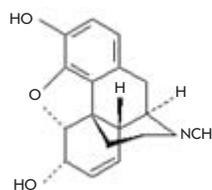


Рис. 10. Морфин – алкалоид мака *Papaver somniferum* – сильный наркотик и мощный анальгетик.

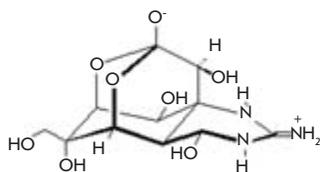


Рис. 11. Тетродотоксин.

которые впервые в индивидуальном состоянии выделили в 1937 г. немецкие исследователи Ф. Линен и Г. Виланд. Отравление токсинами бледной поганки наблюдается довольно часто. Своеобразием действия этих токсинов является достаточно длительный латентный период (до 36 ч), во время которого происходит безболезненное разрушение печени. Когда появляются симптомы, любые методы оказываются малоэффективными – отсюда высокий процент смертности при отравлении. Интересно отметить, что даже один съеденный гриб может привести к смертельному исходу. В то же время в самой бледной поганке содержится пептид антамадин, который в концентрации 1 мг/кг защищает от летального действия токсина. Хорошие результаты, особенно при профилактике, дает гепатозащитный препарат карсил, выделенный из растения *Silybum marianum* и доступный в любой аптеке.

Из небелковых токсинов мы лишь кратко остановимся на токсинах, продуцируемых морскими организмами.

Среди токсинов рыб самым известным является тетродотоксин, который содержится в рыбах семейства Tetraodontidae (рис. 11). Наиболее распространена из этих рыб так называемая рыба-шар, собака-рыба, или по-японски рыба фугу, *Fugu niphobles* и *F. rubripes*. Кроме рыбы фугу, тетродотоксин был выделен из таких животных, как корсиканские лягушки *Atelopus sp.*, краб *Atergatis floridis*, калифорнийский тритон *Taricha torosa*.

Рыба фугу рассматривается в Японии как деликатес для гурманов. Тетродотоксин накапливается в самых различных органах рыбы фугу, но более всего его содержится в икре, печени и в коже. При употреблении в пищу ткани, содержащие тетродотоксин, тщательно удаляются специальными поварами. Однако бывают сезоны, когда тетродотоксин накапливается и в теле рыбы, тогда отравления неизбежны, и нередко они кончаются смертельным исходом. В некоторые годы в Японии погибает несколько сотен человек от употребления в пищу рыбы фугу. Не случайно поэтому эта рыба подается только в специальных ресторанах, причем при входе в такой ресторан обычно имеется надпись: «Хочешь попробовать фугу – напиши завещание».

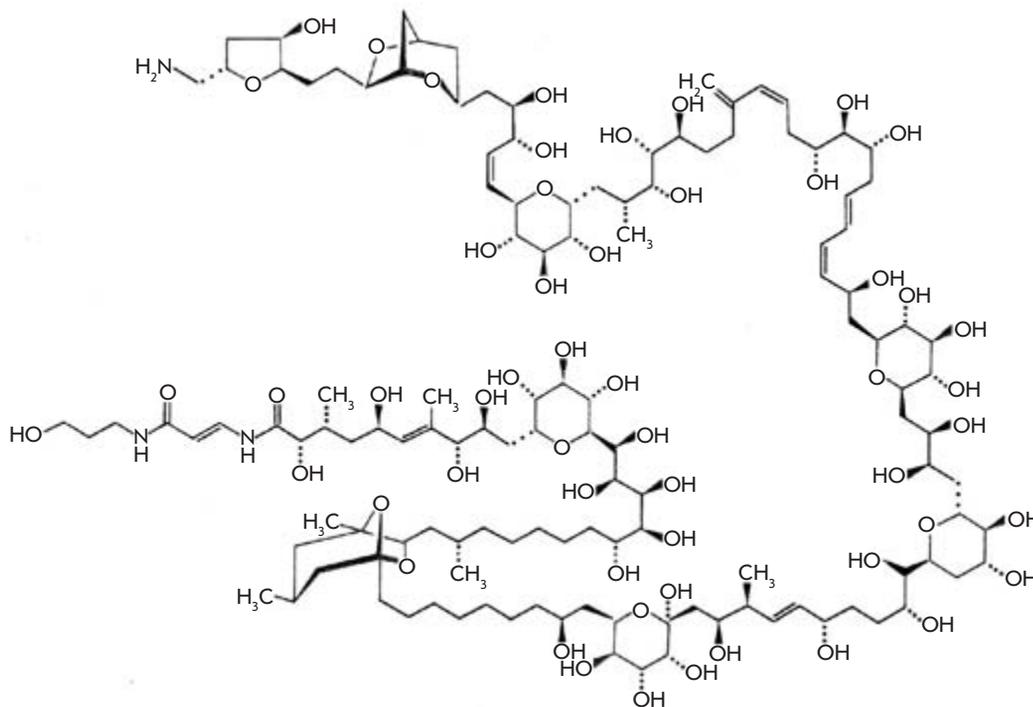
Тетродотоксин является мощным нейротоксином, он вызывает у человека и других млекопитающих паралич скелетной мускулатуры, резкое падение кровяного давления и смерть от остановки дыхания. Летальная доза 7 мкг/кг.

В лабораторных исследованиях он широко применяется для изучения механизма нервной проводимости.

Другим сложным по структуре небелковым токсином морского происхождения является палитоксин (рис. 12). Впервые он был выделен в 1971 г. американскими исследователями Р.Е. Муром и П. Шойером [87] из мягкого коралла *Polytoa toxica*. Многочисленные исследования палитоксина нашли отражение в обстоятельном обзоре [88]. Этот мощный токсин вскоре приобрел дурную славу: его стали именовать «послаником дьявола». Дело в том, что, как только Р.Е. Мур и П. Шойер приступили к его изучению, у них в лаборатории случился очень сильный пожар. Многие, кто имел дело с этим токсином, сильно пострадали, особенно много проблем было отмечено с сердечно-сосудистой системой.

Сложнейшая структура палитоксина была установлена десять лет спустя в 1981 г. независимо двумя группами

Рис. 12. Палитоксин.



исследователей: одна работала в Японии под руководством проф. Й. Хирата [89, 90], а другую возглавил проф. Р.Е. Мур [91]. Установление структуры палитоксина явилось выдающимся событием в биоорганической химии. Его молекула представляет собой уникальную структуру [3] (рис. 12). Изучение стереохимии палитоксина успешно провели те же американские и японские исследователи [92, 93]. Несмотря на огромное число возможных стереоизомеров, группа японских исследователей во главе с проф. Й. Киши [94] успешно провела в 1989 г. общий химический синтез ряда производных палитоксина. Сравнение с природным палитоксином показало, что синтетические образцы были идентичны ему по биологической активности, хроматографическому поведению и по спектральным характеристикам, полученным с помощью спектроскопии ЯМР и масс-спектрометрии [94]. Спустя несколько лет в 1994 г. был синтезирован образец палитоксина, полностью идентичный природному [95]. Следует, однако, отметить, что полный химический синтез палитоксина включает около 65 стадий [96], что лишает его возможности практического использования. Палитоксин обладает мощным физиологическим действием [3]: при внутривенном введении мышам его LD₅₀ составляет 0.15 мкг/кг, для обезьян он еще токсичнее: LD₅₀ составляет 0.08 мкг/кг. Летальный исход наступает через 5–30 мин в результате полного нарушения сердечно-сосудистой деятельности и остановки дыхания. Токсические дозы для различных животных варьируют в пределах LD₅₀ 0.01–0.1 мкг/кг [96]. Конечно, токсическая доза палитоксина для человека экспериментально никогда не определялась, но экстраполяция данных, полученных для животных, приводит к примерно значению LD₅₀ около 0.04 мкг/кг [97]. Несмотря на высокую токсичность, палитоксин был обнаружен в достаточном числе морских беспозвоночных [88, 97]. Интересно отметить, что в сублетальных дозах палитоксин проявляет высокую противоопухолевую активность.

В морях тропического пояса часто наблюдаются «красные приливы», которые приводят к массовой гибели многих

обитателей моря и которые обусловлены массовым размножением токсичных микроводорослей – динофлагеллят. Эти микроводоросли являются продуцентами целого ряда мощнейших токсинов, в том числе и самого сильного из известных в настоящее время небелковых токсинов – маитоксина [98]. Этот токсин впервые был обнаружен в 1976 г. [99] в кишечнике рыбы-хирурга *Stenochaetus striatus* в качестве основного компонента сивватеры – наиболее известного морского пищевого токсина динофлагеллят *Gambierdiscus toxicus*, которые входят в пищевую цепь травоядных рыб. Токсичность маитоксина наивысшая и составляет LD₅₀ около 0.05 мкг/кг для мышей. Маитоксин впервые был выделен в индивидуальном состоянии в 1988 г. группой японских исследователей Университета Тохоку во главе с проф. Т. Ясумото [100]. Строение этого сложнейшего природного соединения, включая элементы стереохимии, было установлено в 1992–1994 гг. [101] той же группой с помощью методов спектрального анализа, включающего все методы спектроскопии ЯМР и масс-спектрометрию. Они же определили абсолютную конфигурацию маитоксина в 1996 г. [102]. В том же году эти данные были подтверждены синтезом, проведенным группой японских ученых под руководством Й. Киши [103].

Таким образом, биоорганическая химия нашла подобающее место среди наук, изучающих основные жизненно важные процессы и вещества, которые принимают в этих процессах самое активное участие. Установлено и устанавливается химическое строение все новых биополимеров и низкомолекулярных биорегуляторов, определяются их биологические функции и физиологическая активность, уделяется много внимания выяснению взаимозависимости структуры и биологической активности. Химики-биоорганики вместе с биохимиками, биотехнологами, физиологами и медиками получают все новые результаты, способствующие продлению активной человеческой жизни. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Спиченкова Н.Е., Васильковский В.Е. // Биоорг. химия. 2009. Т. 35. № 2. С. 279–288.
2. Шемякин М.М., Хохлов А.С. // Журн. общ. химии. 1967. Т. 37. С. 2369–2370.
3. Овчинников Ю.А. Биоорганическая химия. М.: Просвещение, 1987. 815 с.
4. Еляков Г.Б., Стоник В.А. Терпеноиды морских организмов / Ред. Камерницкий А.В. М.: Наука, 1986. 270 с.
5. Еляков Г.Б., Стоник В.А. Стероиды морских организмов / Ред. Камерницкий А.В. М.: Наука, 1988. 208 с.
6. Запорожец Т.С., Беседнова Н.Н. Иммуноактивные биополимеры из морских гидробионтов. Владивосток: НИИЭМ СО РАМН, 2007. 218 с.
7. Стоник В.А. // Acta Naturae. 2009. Т. 1. № 2. С. 16–27.
8. Усов А.И. // Усп. химии. 2009. Т. 78. С. 846–862.
9. Семенов А.А. Очерки химии природных соединений / Ред. Толстиков Г.А. Новосибирск: Наука, 2000. 664 с.
10. Семенов А.А., Карцев В.Г. Основы химии природных соединений. Т. 1. М.: МБФНП, 2009. 624 с.
11. Семенов А.А., Карцев В.Г. Основы химии природных соединений. Т. 2. М.: МБФНП, 2009. 420 с.
12. Кочетков Н.К., Бочков А.Ф., Дмитриев Б.А. и др. Химия углеводов. М.: Химия, 1967. 672 с.
13. Aspinal G.O. // Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 1969. V. 24. P. 333–379.
14. Painter T.J. Algal Polysaccharides // The Polysaccharides. V. 2 / Ed. Aspinal G.O. N.Y., L.: Acad. Press, 1983. P. 263–273.
15. Оводов Ю.С., Головченко В.В., Гюнтер Е.А., Попов С.В. Пектиновые вещества растений Европейского Севера России / Ред. Кучин А.В. Екатеринбург: УрО РАН, 2009. 112 с.
16. Оводов Ю.С. // Север / Ред. Лаженцев В.Н. Сыктывкар: Коми НЦ УрО РАН, 2006. С. 236–257.
17. Оводов Ю.С. // Биоорг. химия. 2000. Т. 35. С. 293–310.
18. Попов С.В. Взаимодействие фагоцитов млекопитающих с полисахаридами растений / Ред. Оводов Ю.С. Сыктывкар: Коми НЦ УрО РАН, 2002. 97 с.
19. Оводов Ю.С. // Биоорг. химия. 1998. Т. 24. С. 483–501.
20. Попов С.В., Оводова Р.Г., Попова Г.Ю. и др. // Биоорг. химия. 2007. Т. 33. С. 187–192.
21. Chihara G., Namuro J., Maeda Y., et al. // Cancer Res. 1970. V. 30. P. 2776–2781.
22. Kanayama H., Adachi N., Togami M. // Chem. Pharm. Bull. 1983. V. 31. P. 1115–1118.
23. Wang Y., Cheng Z., Mao J., et al. // Carbohydr. Polym. 2009. V. 77. P. 713–717.
24. Wang Y.F., Zhang M., Ruan D., et al. // Carbohydr. Res. 2004. V. 339. P. 327–334.

25. Chen X., Xu X., Zhang L., Kennedy J.F. //Carbohydr. Polym. 2009. V. 76. P. 586–591.
26. Stone B.A., Clarke A.E. Chemistry and Biology of (1-3)- β -Glucans. Victoria, Australia: LaTrobe Univ. Press, 1992. 803 p.
27. Chihara G. Cancer Detection and Prevention /Ed. Maltoni C. N.Y.: Acad. Press, 1987. Suppl. 1. P. 423–443.
28. Minato K., Mizuno M., Ashida H., et al. //Int. J. Med. Mushrooms. 1999. V. 1. P. 265–272.
29. Нетрадиционная медицина: Природные и нетрадиционные методы лечения /Пер. с англ. Лихачевой Н. М.: Терра, 1998. С. 83.
30. Евсеенко М.С., Пашков А.С., Автономова А.В. и др. //Биохимия. 2009. Т. 74. С. 657–667.
31. Bao X., Liu C., Fang J., Li X. //Carbohydr. Res. 2001. V. 332. P. 67–74.
32. Bao X., Zhen Y., Ruan L., Fang J.-N. //Chem. Pharm. Bull. 2002. V. 50. P. 623–629.
33. Lin Z., Zhang H. //Acta Pharmacol. Sin. 2004. V. 25. P. 1387–1395.
34. Paterson R.R.M. //Phytochemistry. 2006. V. 67. P. 1985–2001.
35. Wang J., Zhang L.-M. //Carbohydr. Res. 2009. V. 344. P. 105–112.
36. Kohguchi M., Kunikata T., Watanabe N., et al. //Biosci. Biotechnol. Biochem. 2004. V. 68. P. 881–887.
37. Nonaka Y., Shibata H., Nakai M., et al. //Biosci. Biotechnol. Biochem. 2006. V. 70. P. 2028–2034.
38. El Dine R.S., El Halawany A.M., Nakamura N., et al. //Chem. Pharm. Bull. 2008. V. 56. P. 642–646.
39. Wang F., Liu J.-K. //Chem. Pharm. Bull. 2008. V. 56. P. 1035–1037.
40. Yang L., Zhang L.-M. //Carbohydr. Polym. 2009. V. 76. P. 349–361.
41. Sun Z., He Y., Liang Z., et al. //Carbohydr. Polym. 2009. V. 76. P. 628–633.
42. Moradali M.-F., Mostafavi H., Ghods S., Hedjaronde G.-A. //Int. Immunopharmacol. 2007. V. 7. P. 701–724.
43. Chen J., Seviour R. //Mycological Res. 2007. V. 111. P. 635–652.
44. Оводов Ю.С., Оводова Р.Г., Попов С.В. // Фитотерапия, биологически активные вещества природного происхождения. Черноголовка: Биопрогресс, 2003. С. 348–362.
45. Оводов Ю.С., Оводова Р.Г., Лоенко Ю.Н. //Химия природн. соедин. 1983. С. 675–694.
46. Lüderitz O., Westphal O., Staub A.M., Nikaido H. Isolation and Chemical and Immunological Characterization of Bacterial Lipopolysaccharides in *Microbial Toxins* /Eds Weinbaum G., et al. N.Y. – L., 1971. IV. P. 145–233.
47. Boivin A., Mesrobian L. //Compt. Rend. Soc. Biol. 1933. V. 113. P. 490–492.
48. Соловьева Т.Ф., Оводов Ю.С. //Биоорганическая химия. 1983. Т. 9. С. 725–733.
49. Lüderitz O. //Microbiology. 1977. P. 239–251.
50. Ovodov Y.S., Gorshkova R.P., Tomshich S.V. //Immunochemistry. 1971. V. 8. P. 1071–1079.
51. Книрель Ю.А., Кочетков Н.К. //Биохимия. 1994. Т. 59. С. 1784–1851.
52. Knirel Y.A. O-Specific polysaccharides of Gram-negative bacteria // *Microbial Glycobiology: Structures, Relevance and Applications* /Eds Moran A., et al. Amsterdam: Elsevier, 2009. P. 57–73.
53. Калмыкова Е.Н., Горшкова Р.П., Оводов Ю.С. //Химия природн. соедин. 1989. С. 743–763.
54. Rietschel E.T., Kirikae T., Schade F.U., et al. //Immunobiology. 1993. V. 187. P. 169–178.
55. Михайская Л.В., Оводова Р.Г., Оводов Ю.С. //Химия природн. соедин. 1985. С. 493–496.
56. Татаринов Ю.С. Прошлое и будущее онкофетальных белков. М.: Гос. мед. ун-т, 1988. 23 с.
57. Tatarinov Y.S. Human alpha-fetoprotein. M.: Russian State Med. Univ., 1994. 90 p.
58. Abelev G.I. //Int. Contra Cancer. 1963. V. 19. P. 80–92.
59. Татаринов Ю.С. //Тез. докл. I Всесоюз. биохим. съезда. М.–Л., 1963. Т. 2. С. 274.
60. Татаринов Ю.С. //Вопр. мед. химии. 1964. Т. 10. С. 584–589.
61. Tatarinov Y.S. //Nature (Lond.) 1968. V. 217. P. 964–965.
62. Оводов Ю.С. Химия иммунитета. Сыктывкар: Коми НЦ УрО РАН, 1997. 159 с.
63. Елистратова Е.В., Лактионов П.П., Шелестюк П.И. и др. //Биомед. химия. 2009. Т. 55. № 1. С. 15–31.
64. Павленко А.Ф., Курика А.В., Оводов Ю.С. //Усп. соврем. биол. 1988. Т. 106. С. 412–425.
65. Pavlenko A.F., Chikalovets I.N., Kurika A.V., et al. //Tumor. Biol. 1990. V. 11. P. 306–318.
66. Ablin R.J. //J. Cancer Res. Clin. Oncol. 1997. V. 123. P. 583–594.
67. Воробьев А.В. //Вопр. онкол. 2009. Т. 55. № 2. С. 241–249.
68. Костин А.А., Каприн А.Д., Цыбульский А.Д. //Вопр. онкол. 2009. Т. 55. № 2. С. 187–191.
69. Каприн А.Д., Костин А.А., Цыбульский А.Д. //Вопр. онкол. 2009. Т. 55. № 3. С. 285–290.
70. Каприн А.Д., Гафанов Р.А., Фастовец С.В. //Вопр. онкол. 2009. Т. 55. № 3. С. 474–476.
71. Бухарин Б.В. //Соврем. онкол. 1998. Т. 334. С. 667–694.
72. Любавина И.А., Зинченко А.А., Лебедин Ю.С., Чуканов С.В. //Биоорганическая химия. 2007. Т. 33. С. 550–554.
73. Лохов П.Г., Даштиев М.И., Бондарцов Л.В. и др. //Биомед. химия. 2009. Т. 55. № 3. С. 247–254.
74. Friedenreich C.M., Thune I. //Cancer Causes and Controls. 2001. V. 12. P. 461–475.
75. Reid P., Kantoff P., Oh W. //Invest. New Drugs. 1999. V. 17. P. 271–284.
76. Bruckheimer E.M., Kyprianou N. //Cell Tissue Res. 2000. V. 301. P. 153–162.
77. So A.I., Hurtado-Coll A., Gleave M.E. //World J. Urol. 2003. V. 21. P. 325–337.
78. Sonpavde G., Hutson T.E., Berry W.R. //Cancer Treatment Rev. 2006. V. 32. P. 90–100.
79. Han H.-Y., Wen P., Liu H.-W., et al. //Chem. Pharm. Bull. 2008. V. 56. P. 1338–1341.
80. Omoni A.O., Aluko R.E. //Trends Food Sci. Technol. 2005. V. 16. P. 344–350.
81. Kucuk O., Sarnar F.H., Sakr W., et al. //Cancer Epidemiol. Biomarkers Prevention. 2001. V. 10. P. 861–868.
82. Yoshida H., Iwata N., Katzuzaki H., et al. //Biosci. Biotechnol. Biochem. 1998. V. 62. P. 1014–1017.
83. Fujisawa H., Suma K., Origuchi K., et al. //Biosci. Biotechnol. Biochem. 2008. V. 72. P. 2877–2883.
84. Youn H.-S., Lim H.-J., Lee H.-J., et al. //Biosci. Biotechnol. Biochem. 2008. V. 72. P. 368–375.
85. Машковский М.Д. Лекарственные средства. 15-е изд. /Ред. Южаков С.Д. М.: Новая Волна, 2005. С. 146–147.
86. Оводов Ю.С. Избранные главы биоорганической химии. Сыктывкар: Сыкт. ГУ, 1998. 222 с.
87. Moore R.E., Scheuer P.J. //Science. 1971. V. 172. P. 495–498.
88. Katikou P. // Phytotoxins: Chemistry and Biochemistry /Ed. Botana L.M. Ames: Blackwell Publ., 2007. P. 75–93.
89. Hirata Y., Uemura D., Ueda K., Takano S. //Pure Appl. Chem. 1979. V. 51. P. 1875–1883.
90. Uemura D., Ueda K., Hirata Y., et al. //Tetrahedron Lett. 1981. V. 22. P. 2781–2784.
91. Moore R.E., Bartolini G. //J. Am. Chem. Soc. 1981. V. 103. P. 2491–2494.
92. Moore R.E., Bartolini G., Barchi J. //J. Am. Chem. Soc. 1982. V. 104. P. 3776–3779.
93. Cha J.K., Christ W.J., Finan J.M., et al. //J. Am. Chem. Soc. 1982. V. 104. P. 7369–7371.
94. Kishi Y. //Pure Appl. Chem. 1989. V. 61. P. 313–324.
95. Suh E.M., Kishi Y. //J. Am. Chem. Soc. 1994. V. 116. P. 11205–11206.
96. Wiles J.S., Vick J.A., Christensen M.K. //Toxicol. 1974. V. 12. P. 427–433.
97. Taniyama S., Mahmud Y., Terada M., et al. //J. Nat. Toxins. 2002. V. 11. P. 277–282.
98. Satake M. // Phytotoxins: Chemistry and Biochemistry /Ed. Botana L.M. Ames: Blackwell Publ., 2007. P. 47–54.
99. Yasumoto T., Baginis R., Vernoux J.P. //Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 1976. V. 42. P. 359–365.
100. Yokoyama A., Murata M., Oshima Y., et al. //J. Biochem. 1988. V. 104. P. 184–187.
101. Murata M., Naoki H., Matsunaga S., et al. //J. Am. Chem. Soc. 1994. V. 116. P. 7098–7107.
102. Nokomura T., Sasaki M., Matsumori N., et al. //Angew. Chem. Inter. Ed. Engl. 1996. V. 35. P. 1675–1678.
103. Zheng W., DeMattei J.A., Wu J.-P., et al. //J. Am. Chem. Soc. 1996. V. 118. P. 7946–7968.

УДК 577.113.6

Современные тенденции в биотехнологии нуклеозидов

И. А. Михайлопуло^{1*}, А. И. Мирошников²¹Институт биоорганической химии НАН Беларуси, 220141, Минск, ул. Академика Купревича, 5/2, Беларусь²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Россия

*E-mail: igor_mikhailo@yahoo.de

Поступила в редакцию 29.04.2010 г

РЕФЕРАТ В настоящем обзоре рассматриваются новые тенденции в биотехнологии нуклеозидов последнего десятилетия. Постоянно растущий интерес в изучении этого класса соединений стимулируется рядом факторов: (i) растущей потребностью в производстве в больших количествах природных 2'-дезоксид-β-D-рибонуклеозидов, а также их модифицированных по гетероциклическому основанию и углеводному фрагменту аналогов для использования их в синтезе и изучении олигонуклеотидов, в том числе коротких интерферирующих РНК (siRNA), микроРНК (miRNA) и т.п.; (ii) необходимостью создания современных технологий производства биологически важных аналогов природных нуклеозидов, включая противоопухолевые и противовирусные препараты; (iii) необходимостью изучения известных и новых ферментативных превращений нуклеозидов и использования их в качестве инструментов эффективного синтеза новых нуклеозидных аналогов и производных, имеющих биомедицинский потенциал. Эти аспекты будут рассмотрены наряду с краткой ретроспективой этой области исследований.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА нуклеозиды, ферменты метаболизма нуклеиновых кислот, химико-ферментативный синтез, биоимитирующий синтез.

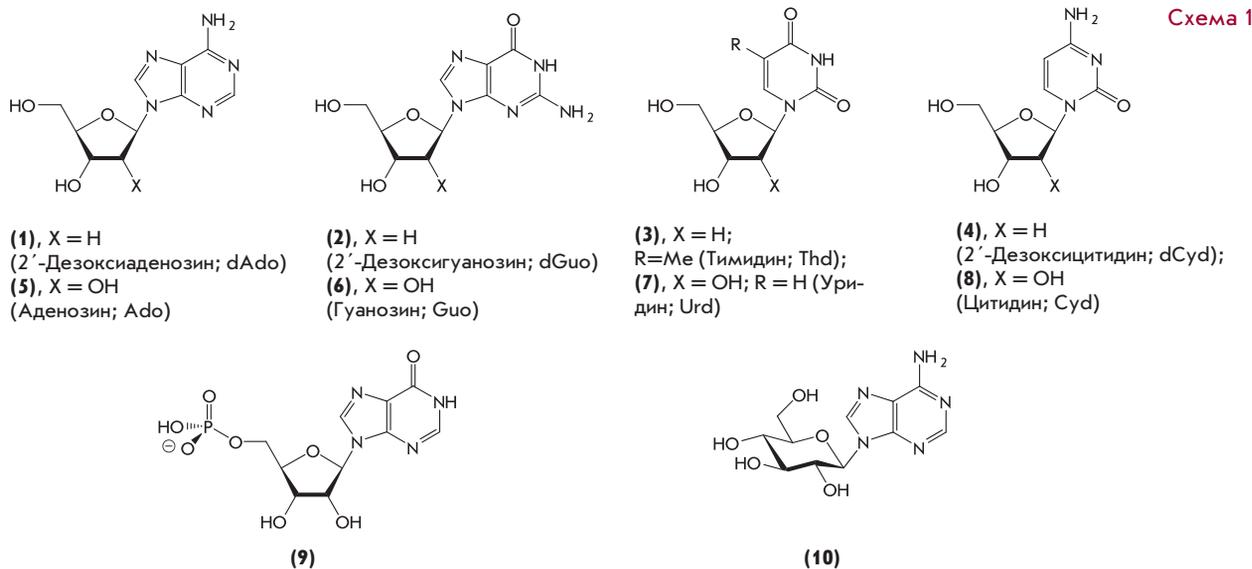
ВВЕДЕНИЕ

Нуклеозиды представляют собой большое семейство природных и химически модифицированных аналогов, характеризующихся огромным структурным разнообразием. Основные компоненты ДНК и РНК – четыре 2'-дезоксид-β-D-нуклеозида аденина (1), гуанина (2), тимина (3) и цитозина (4) и, соответственно, родственные им четыре β-D-рибонуклеозида (5–8) (схема 1). Природные аналоги этих нуклеозидов, углеводный фрагмент или/и агликон которых изменен(ы) различным образом, были найдены в РНК, а также составляют подгруппу нуклеозидных антибиотиков, которая характеризуется удивительным разнообразием структур. 5'-Фосфорилированные нуклеозиды – нуклеотиды, являются важнейшими метаболитами биосинтеза ДНК и РНК, а также косубстратами и кофакторами огромного числа биохимических превращений.

Первый природный представитель семейства нуклеотидов – инозин-5'-монофосфат ((9); IMP; название инозин происходит от греческого *inos* – мышца) был выделен из экстракта мяса *Либихом* (J.F. von Liebig), который описал его свойства интенсифицировать вкус. Синтез НІМР из инозина и его структура как рибонуклеозид-5'-монофосфата были описаны *Левиным* и *Типсоном* (P.A. Levene & R.S. Tipson) 88 лет спустя (схема 1) (см. [1] и работы, цитированные в этой статье). Интересно отме-

тить, что именно *Левин* (P.A. Levene) дал общее имя «нуклеотид» соединениям, содержащим остаток фосфорной кислоты и образующимся в результате гидролиза нуклеиновых кислот, предложил имя «нуклеозид» для дефосфорилированных нуклеотидов и идентифицировал *D*-рибозу и позднее 2-дезоксид-*D*-рибозу в качестве компонентов соответственно РНК и ДНК [2–7].

Пионерские структурные исследования нуклеозидов и нуклеотидов в течение последней декады XIX и начала XX столетий показали, что ДНК и РНК включают в свой состав пять гетероциклических оснований и две пентозы. Первая химическая конденсация двух компонентов была опубликована *Э. Фишером* и *Хелферихом* (E. Fischer & B. Helferich) в 1914 г. [8]; реакция серебряной соли 2,8-дихлорпурина и 2,3,4,5-тетра-*O*-ацетил-α-*D*-глюкопиранозилбромид, последующие удаление защитных групп и дегидрогалогенирование приводили к неприродному нуклеозиду *N*⁹-(β-*D*-глюкопиранозил)аденину (10), структура которого была однозначно установлена *Гулландом* и *Стори* (J.M. Gulland & L.F. Story) спустя 24 года (схема 1) [9]. В промежутке между Первой и Второй мировыми войнами был опубликован ряд статей, посвященных химическому синтезу пиримидиновых и пуриновых нуклеозидов, однако систематические исследования химического синтеза нуклеозидов, нуклеотидов и олигомеров были на-



чаты А. Тоддом (A. Todd) и сотр. в 1942 г. в Университете Кэмбриджа (Англия) и несколько позднее в США. С тех пор опубликовано множество монографий и обзоров, суммирующих огромный прогресс в этой области исследований (см., напр., [10–12]).

Систематические исследования биологических свойств нуклеозидов были начаты во второй половине 1940-х гг. Несколько ранее Филдс и Вудс (P. Fildes & D.D. Woods) сформулировали антиметаболитную теорию и ее положения в применении к дизайну аналогов природных соединений, обладающих биомедицинским потенциалом, стимулировали огромное количество исследований в этой области (см., напр., обзоры [13, 14]). Несмотря на умеренную предсказательную силу этой теории, большой массив синтезированных аналогов природных нуклеозидов и данных об их биологических свойствах (*i*) выявили весьма полезные инструменты изучения биохимических превращений, которые привели к пониманию механизма функционирования ферментов метаболизма нуклеиновых кислот, позволили (*ii*) проанализировать на ряде примеров зависимость структура–активность, что привело к рациональному дизайну новых аналогов с улучшенным соотношением активность–токсичность, и (*iii*) создать ряд противоопухолевых и противовирусных лекарств.

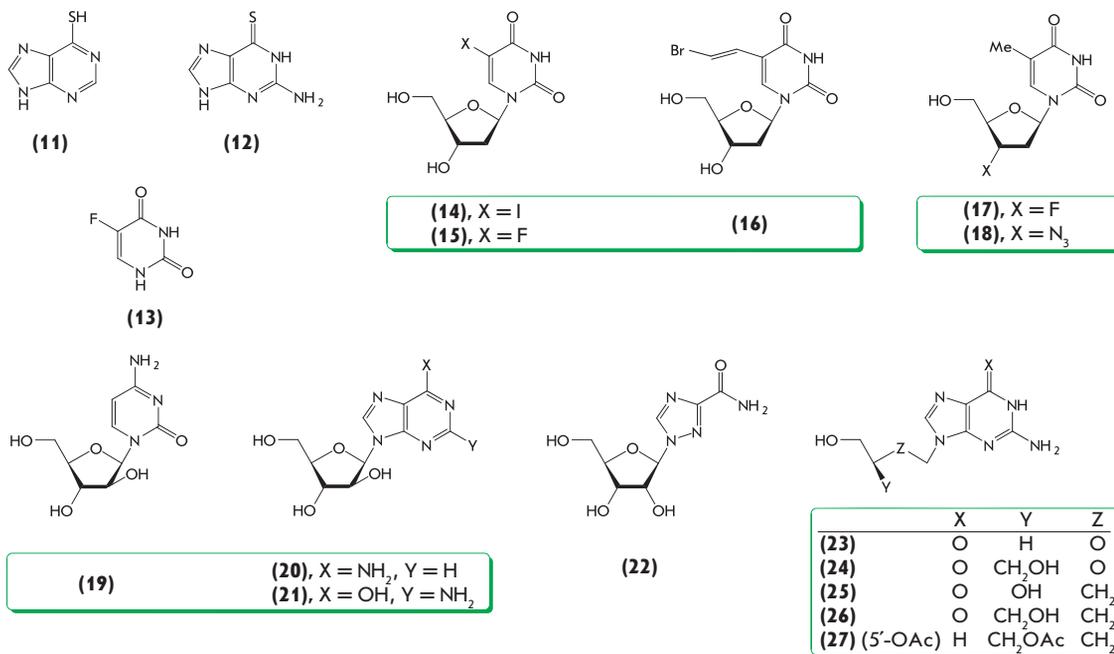
В течение тридцати лет после начала систематических исследований был обнаружен ряд структур-лидеров огромной биологической и медицинской важности, например, гетероциклические основания (6-меркаптопурин (11), тиогуанин (12), 5-фторурацил (13)), аналоги тимидина, модифицированные по С5 агликона (2'-деокси-5-йодуридин (14); Idoxuridine; Iduviran, 2'-деокси-5-фторуридин (15); FUDR; Floxuridine, (*E*)-5-(2-бромвинил)-2'-деоксиуридин (16); BVDU; Brivudine) и при С3' углеводного фрагмента (3'-деокси-3'-фтортимидин (17); FLT; Alovudine и 3'-деокси-3'-азидотимидин (18); AZT; Zidovudine), β-*D*-арабинофуранозилнуклеозиды (1-(β-*D*-арабинофуранозил)-цитозин (19); аС, Cytarabine, -аденин (20); аА, Vidarabine, -гуанин (21); аG), 3-карбоксамидо-1-

(β-*D*-рибофуранозил)-1,2,4-триазол (22); Виразол; Virazole; Ribavirin и гипермодифицированные пуриновые ациклопнуклеозиды, аналоги, у которых углеводный фрагмент нуклеозидов заменен на алифатическую цепь, которая имитирует пентофуранозную часть природных нуклеозидов, а именно, Ацикловир (23); ACV; Zovirax, Ганцикловир (24); DHPG; Cytovene, Буцикловир (25); Buciclovir, Пенцикловир (26); Penciclovir и Фамцикловир (27); 5'-ОАс-производное, согласно нуклеозидной нумерации; «*prodrug*» Пенцикловира; Famciclovir) (схема 2).

Обнаружение большого числа соединений, обладающих высокой противовирусной и/или противоопухолевой активностью, многие из которых были разрешены Агентством по продуктам питания и лекарствам, США (FDA, Food and Drug Administration, USA) к применению в США, а также выделение из природных источников нуклеозидных антибиотиков [15] стимулировали синтез огромного числа модифицированных нуклеозидов. Исследования, направленные на изучение механизмов противовирусной и противоопухолевой активности, дали обширный материал относительно метаболических превращений модифицированных нуклеозидов, об их метаболической активации и дезактивации. Кроме того, эти исследования позволили установить ферментативные реакции, вовлеченные в проявление активности и выяснить роль механизмов утилизации нуклеозидов («salvage»-синтез) и участия вирускодируемых нуклеозидкиназ в осуществлении ключевой стадии активации нуклеозидов – их 5'-монофосфорилирования внутри клетки. Нуклеозидмонофосфаты далее метаболизируют до 5'-дифосфатов и 5'-трифосфатов, и последние включаются в разнообразные метаболические превращения [14, 16–19].

Было установлено, что большинство нуклеозидных аналогов, проявляющих противовирусную и/или противоопухолевую активность в организме, не активны как таковые, но становятся активными после превращения в клетке в нуклеотиды внутриклеточными ферментами. В случае противовирусных агентов, нуклеозид-5'-трифосфаты часто являются настоящими ингибиторами вирусных ДНК-

Схема 2



или РНК-полимераз. В некоторых случаях полимеразы воспринимают аналог природного субстрата и, вводя аналог в растущую цепь, обрывают (терминируют) ее или продолжают рост цепи со значительным замедлением либо приводят к функционально некомпетентному биополимеру [16, 17].

В опухолевых клетках синтез активных соединений инициируется превращением гетероциклических оснований в соответствующие рибонуклеозид-5'-монофосфаты под действием нуклеозид-фосфорилтрансфераз или прямым 5'-фосфорилированием нуклеозидов под действием клеточных нуклеозидкиназ [14, 20–22]. Напротив, в вирусинфицированных клетках, первая, критически важная стадия активации противовирусных нуклеозидов состоит в 5'-монофосфорилировании под действием киназ, кодируемых вирусом [16, 17, 23].

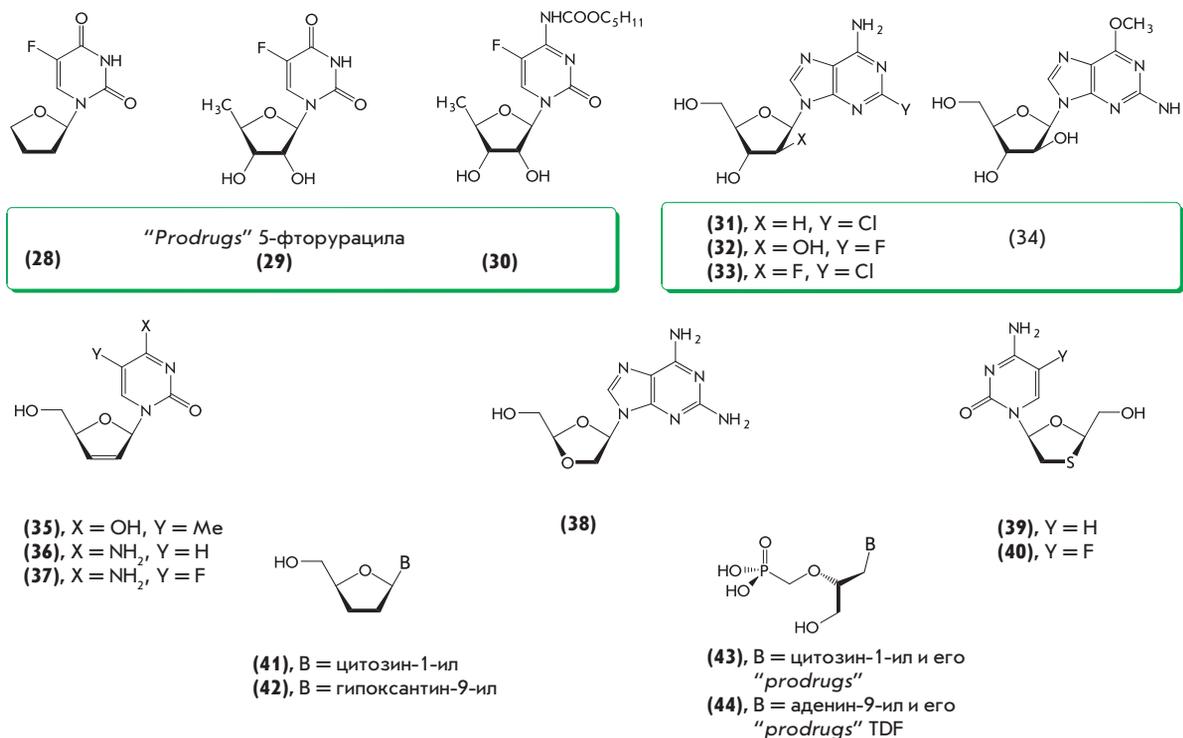
Катаболическая дезактивация биологически активных нуклеозидов часто заключается в дезаминировании цитозиновых и адениновых нуклеозидов под действием соответствующих дезаминаз, приводящем к неактивным производным [14, 24–26], и в фосфоролитическом гидролизе гликозидной связи нуклеозидфосфорилазами с образованием гетероциклических оснований и α -D-пентофураноза-1-фосфатов (см. [24, 27] и работы, цитированные в [27]).

Новые данные относительно метаболизма нуклеозидов и механизма их действия на мишени позволили увеличить активность первоначально обнаруженных соединений-лидеров путем защиты их от катаболических превращений или улучшив их доставку до целей, а также способствовали обнаружению новых биологически активных лидеров [18, 19, 28]. Примером первого подхода являются противоопухолевые средства Фторафур® (28), 5-фтор-5'-дезоксидеоксиридин (29) и Капецитабин ((30); Capecitabine), родственные арабино-А нуклеозиды Кладрибин ((31); CdA; Cladribine), Флударабин ((32); Fludarabine) и Клофарабин ((33); Clofarabine), которые высокоактивны в отношении различ-

ных форм лейкемии и устойчивы к дезаминированию аденозиндезаминазой [21, 22], и противолейкозное средство Неларабин ((34); Nelarabine), «prodrug» aG, с улучшенной в сравнении с первоначальным средством aG растворимостью и более высокой активностью [29] (схема 3).

Выяснение механизма действия AZT и установление в качестве биохимической мишени лекарств против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), обратной транскриптазы, кодируемой вирусом, стимулировало синтез огромного числа разнообразных 2',3'-дидезоксинуклеозидов, например, 2',3'-дидезоксицитидина ((41); ddC; Zalcitabine; Hivid®), 2',3'-дидезоксиинозина ((42); Didanosine) и родственных нуклеозидов с C2'-C3'-двойной связью, 2',3'-дидегидро-2',3'-дидезокситимидина ((35); d4T; Stavudine; Zeret®) и его цитозиновых аналогов ((36); d4C) и ((37), Reverset™), нуклеозидов с атомами кислорода или серы вместо C3'-атома углерода пентофуранозного кольца, 2-амино-2',3'-дидезокси-3'-оксааденозина ((38); Amdoxovir), 2',3'-дидезокси-3'-тиацитидина ((39); 3TC; Lamivudine; EpiVir®), (-)- β -L-3'-тиа-2',3'-дидезокси-5-фторцитидина ((40); (-)FTC; Emtricitabine; Emtriva®), а также большого числа гипермодифицированных ациклических нуклеозидов с фосфонатной функцией и их депо-форм, например, ((43); Cidofovir, В = цитозин-1-ил) и ((44); Tenofovir, В = аденин-9-ил) [30–34] (схема 3).

Следует подчеркнуть, что пионерские исследования Шеффера и сотр. (H.J. Schaeffer) по синтезу и изучению биохимических свойств ациклических нуклеозидов привели к открытию 9-[2-гидрокси(этоксиметил)]гуанина ((23); Ацикловир; Acyclovir) в качестве противовирусного средства [35–38] и стимулировали синтез разнообразных ациклических нуклеозидов, модифицированных по агликону или в ациклическом фрагменте, включая фосфонатные аналоги нуклеозид-5'-фосфатов и их скрытых форм («prodrugs»), которые обнаружили широкий спектр биологической активности [39].



Вплоть до настоящего времени, подавляющее большинство модифицированных нуклеозидов были получены химическими методами. Большое число разработанных с этой целью синтетических подходов можно объединить в три основных направления: (i) конвергентный синтез, в котором используются производные сахаров или имитаторов сахаров в качестве гликозилирующих агентов, (ii) химические превращения природных нуклеозидов и (iii) рациональная комбинация обоих указанных выше подходов. Несмотря на весьма впечатляющий прогресс, достигнутый в развитии химических методов, получение многих противовирусных и противоопухолевых лекарств, а также биологически активных соединений продолжает оставаться серьезной проблемой, что обуславливает высокую стоимость препаратов и, как следствие, ограничивает широкие биологические исследования и терапевтическое применение. Необходимость развития новой стратегии получения рассматриваемых соединений стала очевидна в конце 1970-х гг.

ХИМИКО-ФЕРМЕНТАТИВНАЯ СТРАТЕГИЯ СИНТЕЗА НУКЛЕОЗИДОВ (БИОТЕХНОЛОГИЯ НУКЛЕОЗИДОВ)

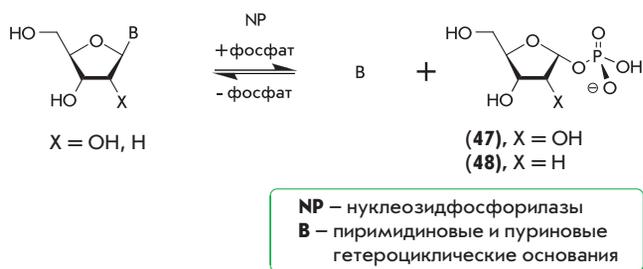
Среди большого числа ферментов обмена нуклеиновых кислот около 20 представляют интерес с точки зрения новых эффективных стратегий получения биологически важных нуклеозидов. Прежде всего, это относится к ферментам, катализирующим конденсацию гетероциклических оснований и сахаров с образованием гликозидной связи, а также к ферментам, катализирующим различные превращения нуклеозидов. Эти ферменты имеют первостепенное значение для изучения и разработки новых подходов к синтезу нуклеозидов.

Параллельно с пионерскими химическими исследованиями и изучением биохимических свойств модифициро-

ванных нуклеозидов были начаты работы по выделению ферментов обмена нуклеиновых кислот из природных источников и изучению механизмов их функционирования (см., напр., обзор [24]). Первые публикации Левина и сотр. [40–44] и Джонса (W. Jones) [45, 46] по активности, гидролизующей нуклеиновые кислоты и расщепляющей нуклеозиды, относятся к 1911 г.; позднее Левин и сотр. описали выделение «нуклеозидазы» из селезенки, почек и поджелудочной железы крупного рогатого скота, которая была способна гидролизовать аденозин и инозин в фосфатном буфере с одинаковой эффективностью, давая соответствующие основания и рибозу (рибозо-1-фосфат не был обнаружен в то время!), и изучили ее свойства [47–49]. Были определены оптимальная температура (37°C) и pH (7.5) реакции и было найдено, что (i) рибоза и аденин оказывают «замедляющее влияние на протекание реакции», (ii) каолин полностью адсорбирует частично очищенный фермент из раствора, при этом комплекс фермент–каолин является стабильным в пределах значений pH 4.0–8.0 при 40°C в течение 15 ч и демонстрирует одинаковый уровень активности и (iii) химически полученный адениновый нуклеозид, содержащий гексозу (структура нуклеозида не была установлена), не являлся субстратом фермента.

Позднее Калкар (H.M. Kalckar) изучил нуклеозидазу из печени крысы и показал, что (i) этот фермент является пурин-нуклеозидфосфорилазой (PNP; КФ 2.4.2.1), которая фосфоролитически гидролизует инозин или гуанозин и при этом образуются рибозо-1-фосфат (позже была доказана структура: α-D-рибофуранозо-1-фосфат; (47); RP) (см. обзоры [24, 50]) и соответствующие пуриновые основания, гипоксантин или гуанин; (ii) инкубация RP с гипоксантином или гуанином в присутствии PNP приводит к быстрому образованию инозина или гуанозина [51, 52]. В статье Калкара

Схема 4



выделение RP в чистой форме было сообщено впервые. Вскоре после этой публикации Мансон и Лампен (*L.A. Manson & J.O. Lampen*) показали, что покоящиеся клетки *Escherichia coli*, а также бесклеточный экстракт содержат ферменты, гидролизующие 2'-дезоксигуанидин и тимидин в присутствии неорганического фосфата до свободных оснований и сложного эфира дезоксирибозы, структура которого была установлена позднее как 2-дезокси- α -D-рибофуранозо-1-фосфат (48) [24, 53]. Авторы предположили, что этот экстракт содержит пурин- и пиридин-нуклеозидфосфорилазы, специфичность которых оказалась подобна таковой ферментам млекопитающих. Более того, было представлено доказательство того, что эти бактериальные ферменты обратимо катализируют синтез нуклеозидов и их фосфоролитический гидролиз (схема 4).

Последующие исследования подтвердили и расширили эти фундаментальные наблюдения и показали, что пурин-нуклеозидфосфорилаза специфична в отношении 9-(β -D-пентофуранозил)пуринов, причем PNP из млекопитающих специфична в отношении 6-оксопуринов (ср. с приведенными выше данными Левина и сотр. [47–49]) и их нуклеозидов, а также некоторых аналогов, тогда как PNP из бактериальных источников проявляет очень широкий спектр специфичности, используя в качестве субстратов 6-оксо- и 6-аминопурины и их нуклеозиды наряду с многочисленными аналогами.

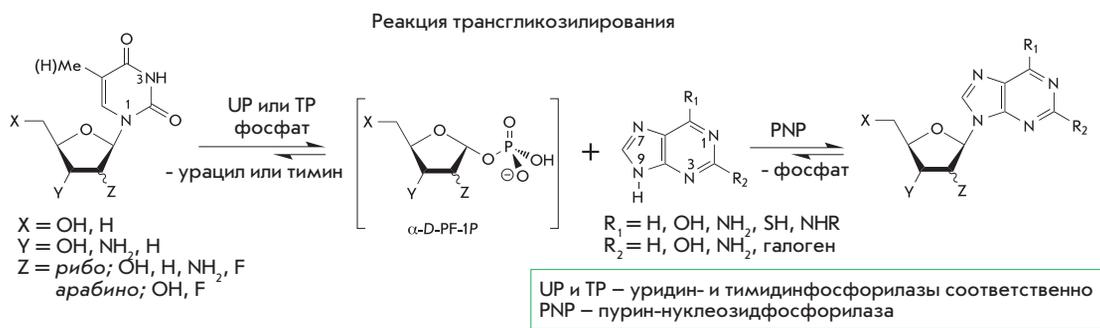
Тимидинфосфорилаза (TP; КФ 2.4.2.4) обратимо катализирует фосфоролитический гидролиз тимидина (3) и 2'-дезоксидеоксиуридина, но не уридина (7) и 1-(β -D-арабинофуранозил)тимидина и -урацила, тогда как уридинфосфорилаза (UP; КФ 2.4.2.3) не различает β -D-рибофуранозу и 2'-дезоксидеокси- β -D-рибофуранозу в пиридиновых нуклеозидов и акцептирует в качестве субстратов 1-(β -D-арабинофуранозил)-пиридинидины. Цитозин и его нуклеозиды не являются

субстратами TP и UP, однако следует отметить два неожиданных наблюдения. Так, PNP в некоторых экспериментах обнаружила цитозинфосфорилазную активность [54]. Было также показано, что человеческая дезоксицитидинкиназа – цитозольный фермент, который играет ключевую роль в активации терапевтически важных нуклеозидных аналогов посредством их 5'-монофосфорилирования, фосфоролитически расщепляет природные 2'-дезоксинуклеозиды, включая 2'-дезоксидеоксигуанидин, до свободных гетероциклических оснований и 2-дезоксидеокси- α -D-рибофуранозо-1-фосфата [55].

Результаты пионерских исследований однозначно указывали на возможность ферментативного синтеза нуклеозидов исходя из пуриновых или пиридиновых гетерооснований, используя или α -D-пентофуранозо-1-фосфат, или другой нуклеозид в качестве донора углеводного фрагмента (см. обзоры [24, 56]). Первые попытки использовать ферменты для синтеза пиридиновых нуклеозидов были предприняты Фридкин и Робертсом (*M. Friedkin & D. Roberts*) на примере синтеза тимидина и родственных нуклеозидов [57, 58] и Душинским и Хайдельбергером (*R. Duschinsky & C. Heidelberger*) при синтезе 5-фтор-2'-дезоксидеоксиуридина (FUDR, (15)) и 2'-дезоксидеокси- β -D-рибофуранозил-5-трифторметилурацила (CF_3 -dUrd) [59–64]. Интересно отметить, что первое сообщение о синтезе FUDR ферментативным переносом остатка 2-дезоксидеоксирибофуранозы тимидина на 5-фторурацил (13) появилось в 1957 г. [59], затем препаративный ферментативный процесс был запатентован [60]. Эта же группа исследователей описала химический метод синтеза 5-фтор-2'-дезоксидеоксиуридина (15), а также ферментативный синтез с низким выходом другого противоопухолевого нуклеозида – CF_3 -dUrd, используя бесклеточный экстракт клеток *E. coli* в качестве источника тимидинфосфорилазы [36] (см. также обзоры [24, 56, 65–68]). Позднее ряд 5-замещенных нуклеозидов урацила, включая 2'-дезоксидеокси-5-йодуридин ((14); 55%), 5-фтор-2'-дезоксидеоксиуридин ((15); 65%) и E-5-(2-бромвинил)-2'-дезоксидеоксиуридин ((16); 61%), был получен с использованием тимидина (3) или 2'-дезоксидеоксигуанидина (2) в качестве доноров 2-дезоксидеоксирибофуранозы, соответствующих гетерооснований в качестве акцепторов и селекционированных клеток *E. coli* BM-11 в качестве биокатализатора [69].

Перенос пентофуранозного фрагмента пиридиновых нуклеозидов на пуриновые гетерооснования и наоборот (реакция трансгликозилирования), катализируемый бактериальными нуклеозидфосфорилазами (NP), был продемонстрирован как очень эффективная методология синтеза

Схема 5



большого числа аналогов природных пуриновых и пиримидиновых нуклеозидов высокой биологической и фармацевтической важности. Наиболее используемый путь заключается в переносе пентофуранозного фрагмента пиримидиновых нуклеозидов на пуриновые гетерооснования (схема 5).

Этот путь трансгликозилирования основывается на большом числе эффективных химических превращений легкодоступных природных пиримидиновых нуклеозидов в разнообразные, модифицированные по углеводному остатку аналоги через промежуточное образование *O*²,2'(3';5')-ангидро-производных и последующее раскрытие ангидро-кольца под действием нуклеофильных агентов. Подобный подход к получению родственных пуриновых нуклеозидов не имеет, к сожалению, практического значения. Более того, различия в субстратной специфичности ТР и УР обуславливают возможность использования в реакциях трансгликозилирования большого числа доноров пентофуранозного остатка с оптимальной эффективностью. Так, например, 1-(2-дезоксидеокси-2-фтор-β-D-рибофуранозил)-урацил (схема 5, X = Y = OH; Z = *рибо*-F) и 1-(2-дезоксидеокси-2-фтор-β-D-арабинофуранозил)тимин (схема 5, X = Y = OH; Z = *арабино*-F) не обнаружили субстратной активности в отношении УР, и по этой причине УР не может быть использована в качестве биокатализатора; напротив, оба нуклеозида оказались низкоактивными, но все же субстратами ТР, что позволило использовать этот фермент в трансгликозилировании пуриновых оснований [70, 71].

Успешное использование нуклеозидфосфорилаз в качестве биокатализаторов для синтеза пуриновых арабинозидов и многочисленных нуклеозидов, модифицированных по гетерооснованию и углеводному фрагменту, описаны в большом числе публикаций (см. обзоры [24, 56]).

В реакции трансгликозилирования с успехом были использованы три типа биокатализаторов: (i) селекционированные целые бактериальные клетки, проявляющие УР- и/или ТР- и РNP-активности; (ii) целые бактериальные клетки-продуценты, экспрессирующие в большом количестве рекомбинантные нуклеозидфосфорилазы, и (iii) очищенные рекомбинантные ферменты.

Целые бактериальные клетки в качестве биокатализаторов представляют собой, по сути, иммобилизованные природой ферменты, обеспечивающие рассматриваемые превращения. Использование биокатализаторов этого типа имеет определенные преимущества (относительно низкая стоимость) по сравнению с применением очищенных или иммобилизованных (инкапсулированных) ферментов. Следует, однако, учитывать, что целые бактериальные клетки могут обладать активностями, которые будут катализировать превращение субстрата и желаемого продукта реакции трансгликозилирования в производное, не представляющее интереса (см. ниже). С другой стороны, огромный прогресс, достигнутый в получении рекомбинантных ферментов на практическом уровне, делает эти биокатализаторы доступными для широкого применения, включая разработку биотехнологических процессов производства лекарств. В случае очень низкой субстратной активности донора пентофуранозного остатка или гетероциклического основания-акцептора применение очищенных рекомбинантных ферментов в качестве биокатализаторов представляет разумную альтернативу целым бактериальным клеткам.

Следует отметить, что побочные активности целых бактериальных клеток в ряде случаев могут быть рационально использованы для синтеза желаемого нуклеозида. Так, например, селекционированные клетки *E. coli* ВМ-11, обнаружившие наряду с УР- и РNP-активностями также высокую активность цитидиндезаминазы, были применены для синтеза аG (21) (15 мМ К-фосфатный буфер (рН 6.75), 60°C, 45 ч; выход в расчете на выделенный продукт 48–53%), с использованием арабинозида цитозина (19) и 2'-дезоксигуанозина (2) в качестве доноров соответственно *D*-арабино-фуранозного остатка и гуанина (51), образующегося *in situ* из dG-uo (схема 6) [72]. Деаминарование аС до арабинозида урацила (49) цитидиндезаминазой предшествует образованию α-*D*-арабинофуранозо-1-фосфата (50) из аU под действием УР.

Подобный подход был использован для синтеза 2'-дезоксидеокси-2'-фторгуанозина с 2'-дезоксидеокси-2'-фторцитидином в качестве донора 2-дезоксидеокси-2-фтор-

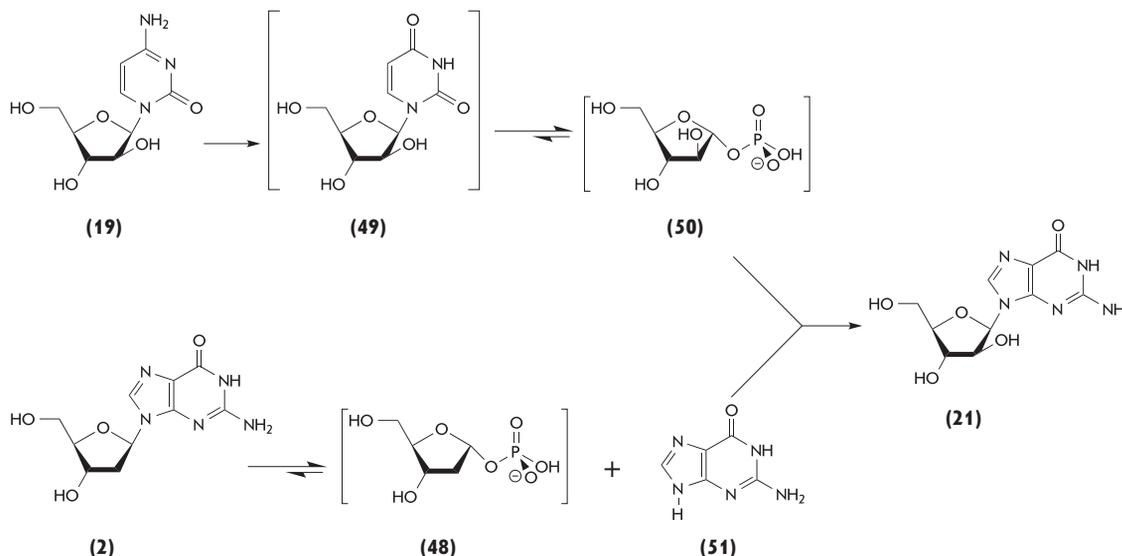
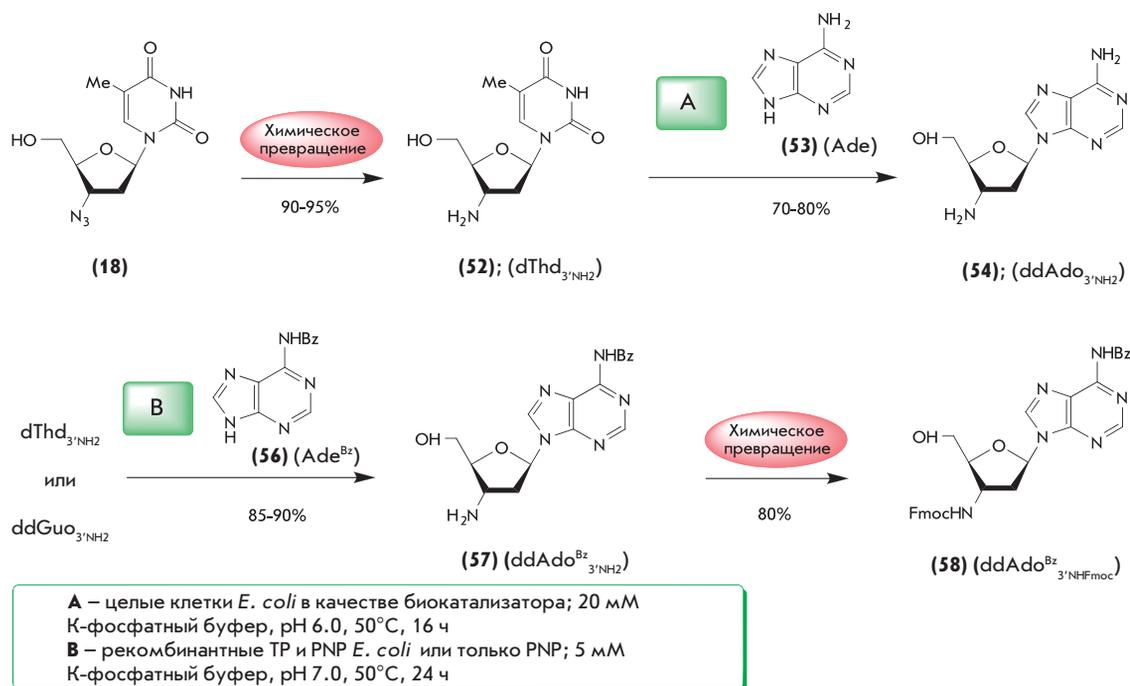


Схема 7



α -D-рибофуранозо-1-фосфата [73]; следует отметить, что селекционированные клетки *E. coli* ВМТ-4D/1А в качестве катализатора синтеза 2'-дезоксидезокси-2'-фторгуанозина [73] представляются предпочтительными в сравнении с очищенными UP и PNP [70, 71].

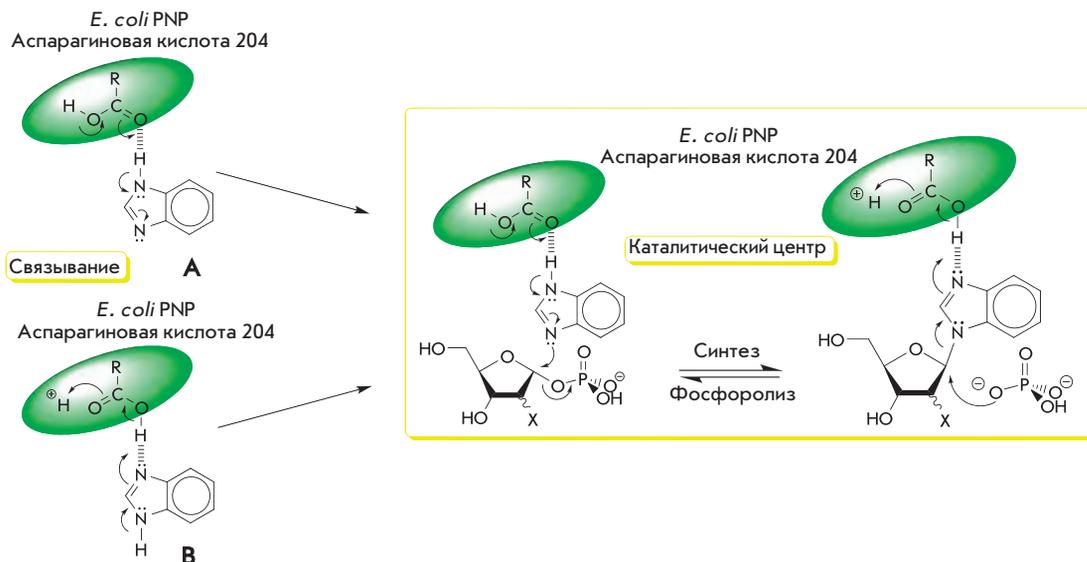
Использование селекционированных клеток *E. coli* оказалось весьма эффективным в химико-ферментативном синтезе пуриновых 3'-амино-2',3'-дидезокси- β -D-рибонуклеозидов (схема 7) [74]. Следует отметить, что AZT (18) не является субстратом ни TP, ни UP и по этой причине не может быть использован в качестве донора пентофуранозного остатка. Восстановление азидогруппы AZT дает 3'-амино-2',3'-дидезокситимидин ((52); dThd_{3'-NH₂}), который оказался удовлетворительным субстратом TP, что позволило его использовать в качестве донора углеводного остатка. Перенос пентофуранозного остатка от dThd_{3'-NH₂} к аденину, катализируемый целыми клетками *E. coli* (20 mM К-фосфатный буфер (pH 6.0), 50°C, 16 ч), протекал удовлетворительно, и желаемый 3'-амино-2',3'-дидезоксиаденозин ((54); ddAdo_{3'-NH₂}) был получен с хорошим выходом. Однако замена аденина (53) на N⁶-бензоиладенин (56) в аналогичной реакции трансгликозилирования приводила к получению ddAdo_{3'-NH₂} (54) вместо ожидаемого N⁶-бензоильного производного ddAdo_{3'-NH₂} (57) вследствие побочной активности целых клеток.

Принимая во внимание, что ddAdo_{3'-NH₂} с ортогонально защищенными аминогруппами (58) представляет интерес для синтеза олигонуклеотидов, мы недавно изучили реакцию трансгликозилирования с использованием очищенных рекомбинантных TP и PNP из *E. coli* [75]. Было найдено, что использование Thd_{3'-NH₂} в качестве донора остатка пентофуранозы и TP и PNP в качестве биоката-

лизаторов или комбинации донора ddGuo_{3'-NH₂} и биокатализатора PNP (5 mM К-фосфатный буфер (pH 7.0), 50°C, 24 ч) приводит к получению желаемого N⁶-бензоильного производного ddAdo_{3'-NH₂} (57) с высоким выходом (схема 7) [76]. Стандартная обработка последнего Fmoc-OSU дает ddAdo_{3'-NH₂}^{Bz} (58) с ортогонально защищенными аминогруппами.

Возможные области применения нуклеозидфосфорилата для синтеза нуклеозидов, а также ограничения этой методологии были изучены в деталях, однако некоторые очень интересные ферментативные реакции заслуживают рассмотрения, так как они дают ключ к пониманию механизма преобразований, катализируемых этими ферментами, и расширяют возможные области их применения.

Известно много публикаций, показывающих, что N⁷-атом пуринов играет очень важную роль в процессе фосфоролитического разрыва гликозидной связи пуриновых нуклеозидов (см. [77, 78] и работы, цитированные в [77]) и, по-видимому, также в обратной, синтетической реакции, катализируемой PNP *E. coli*, хотя механизм этой реакции до сих пор адекватно не изучен. Обнаружение высокой субстратной активности 3-дезазапуринов [79–81], 1-дезаза-, 3-дезаза- и 1,3-дидезазапуринов (бензимидазолов, включая фтор-, хлор- и бромзамещенные) [82–84] в отношении PNP *E. coli* дает основание предположить ключевую роль двух атомов азота имидазольного кольца в рассматриваемой реакции, а именно один из них участвует в связывании гетерооснования в активном центре фермента, что приводит по всей вероятности к повышению нуклеофильности второго атома азота. Последнее обстоятельство способствует атаке этого атома азота на электрофильный C1-атом углерода α -D-пентофуранозо-1-



фосфата и, в конечном итоге, приводит к образованию гликозидной связи (схема 8).

Примечательно, что механизм синтетической реакции, катализируемой нуклеозидфосфорилазами, не привлек достаточного внимания исследователей, и многие важные детали остаются невыясненными. Так, например, тип первоначального связывания субстрата или ингибитора с PNP *E. coli* (ср. типы связывания **A** и **B** на схеме 8) мог бы пролить свет на механизм функционирования фермента и дать ключ к пониманию некоторых необычных наблюдений. Участие двух атомов азота в этой реакции представляется очевидным, если принять во внимание, что 7-дезазагипоксантин ((**61**); 7-ДАН) является очень мощным ингибитором PNP (схема 8) [50, 85]. Туберцидин (**59**) и 7-дезазаинозин (**60**) не являются субстратами PNP и обнаружили очень

низкое сродство к активному центру фермента. Напротив, свободное основание, 7-дезазагипоксантин (**61**), узнается ферментом и образует очень прочный комплекс PNP-фосфат-7-ДАН, что приводит к полному ингибированию фермента [85].

Тип связывания 7-ДАН в активном центре PNP *E. coli* не выяснен; в принципе, можно предположить два разных типа связывания – **A** и **B**. Первый из них, тип **A**, подобен одному из двух возможных способов связывания природного субстрата в активном центре PNP посредством водородной связи карбоксила остатка аспарагиновой кислоты-204 (ср. тип **A** на схеме 8 и тип **A** на схеме 9). Очевидно, что тип **A** связывания 7-ДАН в активном центре PNP *E. coli* не может приводить к образованию нуклеозида ввиду отсутствия N^9 -атома азота (пуриновая нумерация). Тип свя-

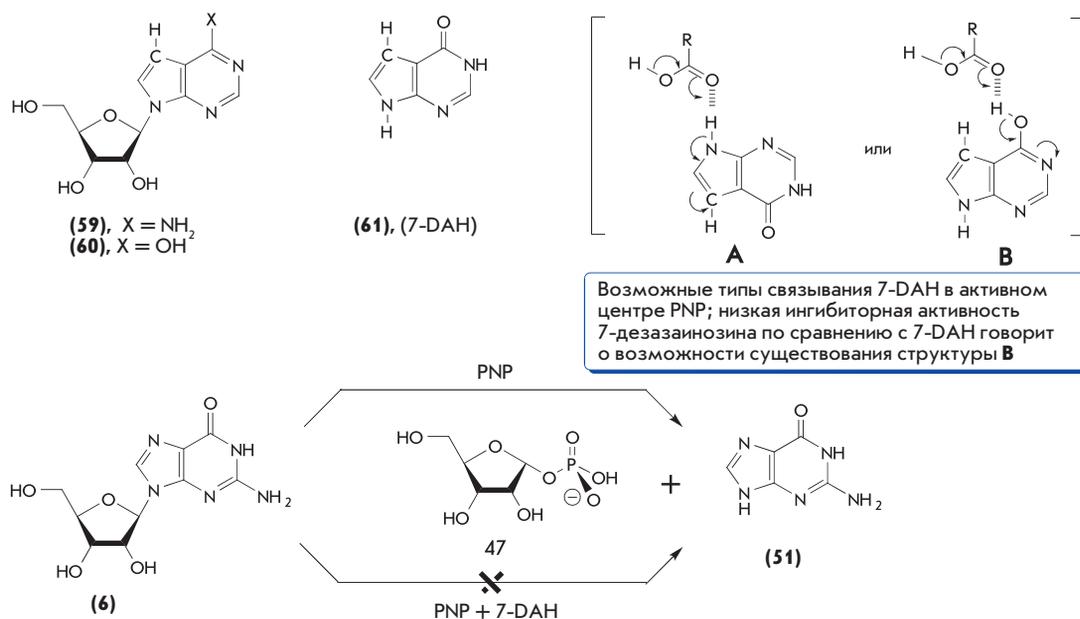
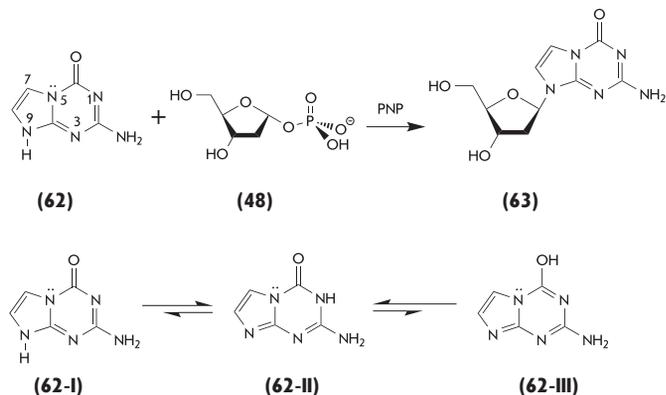


Схема 10



зывания **В** состоит в образовании необычной водородной связи между ОН-группой таутомерной формы циклического амида, что может, по-видимому, приводить также к стабилизации комплекса PNP-фосфат-7-ДАН (N^9 -H-структура), электронная или пространственная структура которого затрудняет или предотвращает нуклеофильную атаку на С1-атом α -D-пентофуранозо-1-фосфата (**47**) (схема 9).

Гипотетическая возможность образования структуры типа **В** неожиданно находит поддержку в удовлетворительной акцепторной активности 5-аза-7-дезазагуанина (**62**) в реакции гликозилирования с использованием 2-деокси- α -D-пентофуранозо-1-фосфата (**48**) в качестве углеводного донора и PNP (из селезенки быка; Sigma) (см. [86] и работы, цитированные в этой статье). Действительно, гетерооснование может существовать в трех таутомерных формах (**62-I-III**), и одна из них, структура (**62-III**), может узнаваться PNP и тем самым приводить к образованию нуклеозида в результате нуклеофильной атаки свободного N^9 -атома азота на С1-атом углерода углеводного субстрата (схема 10). Следует, однако, отметить, что расчеты методами *ab initio* (6-31G**) и полуэмпирическими (PM3, в воде) (HyperChem 8.1) таутомерных структур показали, что структура **II** является термодинамически наиболее стабильной, тогда как структуры **III** и **I** менее стабильны (И.А. Михайлопуло, не опубликовано).

Представляется очевидным, что тип связывания 7-ДАН и 5-аза-7-дезазагуанина (**62**) в активном центре PNP и возможные пути использования этих данных для получения некоторых нуклеозидов 7-дезазагуанина заслуживают более детального изучения.

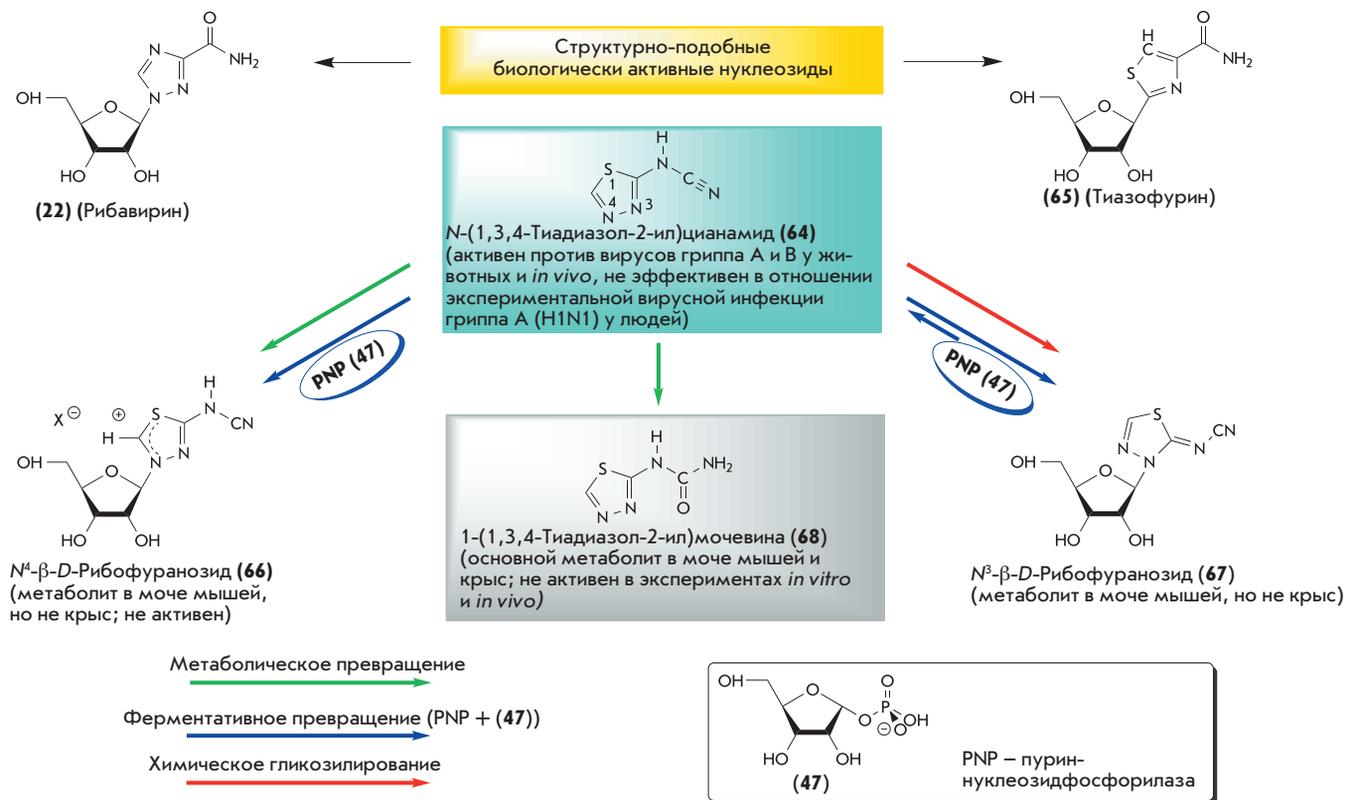
Метаболические и ферментативные превращения противовирусного соединения N -(1,3,4-тиадиазол-2-ил)цианамид (LY217896; (**64**)) (схема 11) представляют собой другой пример совершенно необычных биотрансформаций [87, 88]. Это соединение обнаруживает некоторое структурное сходство с гетероциклическими основаниями противовирусного нуклеозида Виразол ((**22**); Ribavirin) и противоопухолевого С-нуклеозида тиазофурина (**65**). Оно проявило активность против вирусов гриппа типа А и В *in vitro* и на моделях животных, но оказалось неэффективным в клинических тестах против экспериментальной инфекции вируса А (H1N1). Несколько метаболитов этого ге-

тероцикла были обнаружены в экспериментах на клетках млекопитающих, а также животных, и структура трех метаболитов была установлена (схема 11). Следует отметить, что 1-(1,3,4-тиадиазол-2-ил)мочевина (**68**), которая является главным метаболитом у мышей и крыс, не обнаружила активности в экспериментах *in vivo* и *in vitro*.

Было найдено, что пурин-нуклеозидфосфорилазы из селезенки теленка и эритроцитов человека, а также бактериальный фермент (Sigma, N-8265) катализируют превращение тиадиазольного гетероцикла в присутствии α -D-рибофуранозо-1-фосфата (**47**) в N^4 - и N^3 -рибозиды (**66**) и (**67**) (37°C, 20–70 ч, 2–200 ед. PNP; соотношение N^4 - и N^3 -рибозидов $\approx 1 : 3$ (60–65% суммарный выход) при высоких концентрациях PNP и $\approx 3 : 1$ (12–14% суммарный выход) при низких концентрациях PNP) [89]. Интересно, что образование мезоионного [88] или ионного (как показано на схеме 11) N^4 -рибозида (**66**) протекает, по-видимому, необратимо, тогда как N^3 -рибозид (**67**) оказался субстратом PNP.

Нельзя не отметить некоторые удивительные находки этого блестящего исследования. Во-первых, тиадиазольное основание проявляет широкий спектр противовирусной активности *in vitro* и в моделях на животных против ортомиксо- и парамиксовирусов; при оральном или внутривенном введении, а также в качестве аэрозоля защищает мышей против летальных вирусных инфекций гриппа А или В, однако не проявляет токсичности и активности против гриппа в фазе I изучения на здоровых волонтерах [89]. Во-вторых, результаты по фармакокинетике тиадиазольного основания также отличаются большим разнообразием. В-третьих, в отличие от изложенного выше, PNP млекопитающих и бактериальной природы проявляют близкое каталитическое подобие в реакции рибозилирования основания, несмотря на хорошо известные различия субстратных свойств двух указанных типов PNP в отношении природных субстратов. Эти данные указывают на то, что N -(1,3,4-тиадиазол-2-ил)цианамид (**64**), не имеющий общих с природными субстратами структурных особенностей, обладает функциональностью, которая достаточна для реализации синтетической реакции, катализируемой двумя различными типами пурин-нуклеозидфосфорилаз. Тестирование новых гетероциклических оснований в качестве субстратов PNP может привести к обнаружению этой функциональности, что, в свою очередь, расширит представления о механизме функционирования и синтетических возможностях фермента.

Использование целых бактериальных клеток в качестве биокатализатора реакции трансгликозилирования (схема 5) предполагает, что клетки содержат UP, TP и PNP. У бактерий помимо указанных нуклеозидфосфорилаз были обнаружены некоторые другие фосфорилазы, представляющие интерес для ферментативного синтеза нуклеозидов. Например, нуклеозидфосфорилаза, выделенная из *Klebsiella* sp. штамм LF1202, обнаружила очень интересные свойства [90]. Она состоит из пяти идентичных субъединиц с молекулярной массой 25 000 Да, согласно SDS-ПААГ-электрофорезу, и проявляет активность пиримидин- и пурин-нуклеозидфосфорилаз. Инозин, аденозин (**5**), 2'-дезоксаденозин (**1**), гуанозин (**6**) и 2'-дезоксигуанозин (**2**) обнаружили одинаковые субстратные свойства (отн.



активность ≈100%) в фосфоролизе (величины K_m для инозина и неорганического фосфата (P_i) равны соответственно 0.66 и 0.56 мМ); 2'-дезоксидинозин оказался в 2.5 раза более активным субстратом; ксантозин и его 2'-дезоксипроизводное не обнаружили субстратных свойств. В реакции синтеза субстратные свойства гипоксантина и аденина были схожи (величины K_m для гипоксантина и α-D-рибофуранозо-1-фосфата (47) равны 0.45 и 0.14 мкМ соответственно); гуанин оказался несколько менее активным в синтетической реакции. Что касается пиримидиновых нуклеозидов, уридин оказался лучшим субстратом (отн. активность 368%) в сравнении с 2'-дезоксидуридином (95%) и тимидином (29%); близкие по величине константы Михаэлиса K_m были найдены для уридина (0.38 мМ) в реакции фосфоролиза и для урацила в синтетической реакции (0.44 мМ). Субстратная активность урацила в синтетической реакции с α-D-RF-1P и 2-деокси-α-D-рибофуранозо-1-фосфатом (48) равна соответственно 82 и 39%; тимин проявил несколько меньшую активность в реакции с 1-фосфатом (48) (17%); цитидин и 2'-дезоксидитидин, а также цитозин не обнаружили субстратной активности в ферментативных реакциях.

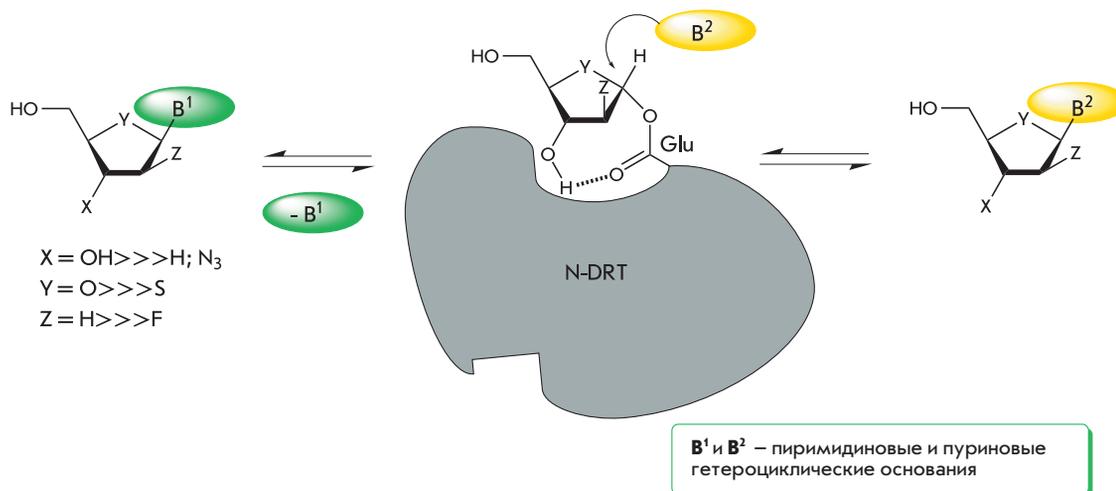
Нуклеозидфосфорилаза *Klebsiella* sp. была использована для синтеза аА из аU и аденина (молярное соотношение 3 : 1). По данным ТСХ, в оптимизированных условиях реакции (0.1 М К-фосфатный буфер, рН 8.0; в 1 мл реакционной смеси: концентрация аденина 6.7 мМ и 0.86 ед. фермента; 50°C, 30 ч) ≈90% аденина превращается в аА [90].

Ширае и Екозэки (H. Shirae & K. Yokozeki) выделили из *Erwinia carotovora* AJ 2992 фермент, катализирующий

фосфоролиз оротидина (OrP), и изучили его свойства [91]. Оротидин подвергался необратимому фосфоролизу до оротовой кислоты и 1-фосфата (47), и фермент не обнаружил строгой специфичности. Действительно, уридин оказался на два порядка более активным субстратом в сравнении с оротидином (отн. активность соответственно 100 и 1%); более того, 5-метилуридин (10%), аU (11%), 2'-дезоксидуридин (22%), 3'-дезоксидуридин (11%) и 2',3'-дидезоксидуридин (1%) оказались субстратами препарата OrP. Уридинфосфорилаза присутствовала в препаратах OrP на каждой стадии очистки OrP, и авторам не удалось разделить два типа активности. Обе активности проявлялись в виде одной полосы при SDS-ПААГ-электрофорезе, что позволяет предположить идентичность двух белков. Очищенный фермент имел молекулярную массу 68000 ± 2000 Да, что предполагает димерную структуру. Наиболее интересное наблюдение состоит в том, что оптимальные температуры и значения рН фосфатного буфера составляют 60°C и 6.0 для оротидинфосфорилазной активности и 70°C и 7.0 для уридинфосфорилазной. В целом, несмотря на различия в оптимальных условиях проявления двух активностей, можно предположить, что препарат фермента из *E. carotovora* AJ 2992 представляет собой UP с широким спектром субстратной специфичности.

N-Дезоксирибозилтрансферазы [DRT; нуклеозид:пурин-(пиримидин)-дезоксидрибозилтрансферазы; КФ 2.4.2.6] представляют собой другой тип ферментов, которые имеют большое значение как биокатализаторы синтеза нуклеозидов (обзор пионерских работ см. [92]). В отличие

Схема 12



от нуклеозидфосфорилаз, DRT катализируют прямой перенос фрагмента дезоксирибозы между нуклеозидом и гетерооснованием-акцептором без промежуточного образования фосфата 2-дезоксид-*D*-рибофуранозы. Реакция протекает через промежуточное образование ковалентно связанного остатка 2-дезоксид- α -*D*-рибофуранозы, гликозидный гидроксил которой и карбоксил глутаминовой кислоты активного центра фермента образуют сложноэфирную связь (схема 12) (см. [93] и работы, цитированные в этой статье).

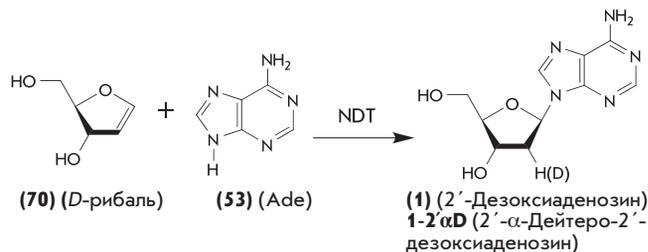
DRT присутствуют главным образом в некоторых видах бактерий семейства *Lactobacillus* и были первоначально обнаружены МакНаттом (*W.S. MacNutt*) [94] в *Lactobacillus helveticus* и выделены Рущем и Бетцом (*A.H. Roush & R.F. Betz*) [95]; позднее DRT была очищена из *L. leichmanii* Бекком и Левиным (*W.S. Beck & M. Levin*), и ее свойства были изучены [96]. Бактерии *Lactobacillus* содержат белки с двумя типами ферментативной активности, которые были первоначально выделены Холгиным и Кардино (*L. Holguin & R. Cardinaud*) аффинной хроматографией из *L. helveticus*: DRT класса I (другое название пурин-дезоксидрибозилтрансфераза, PDT), которые специфично переносят остаток 2-дезоксид-*D*-рибофуранозы от пуринового нуклеозида к пуриновому основанию, и DRT класса II (другое название нуклеозид-дезоксидрибозилтрансфераза, NDT), катализирующие перенос 2-дезоксид-*D*-рибофуранозы между пурин-пуринами, пиримидин-пиримидинами и пурин-пиримидинами [97]. В ранних работах по субстратной специфичности DRT были обнаружены (i) строгая специфичность в отношении 2-дезоксид-*D*-рибофуранозы и отсутствие субстратных свойств у β -*D*-рибонуклеозидов [92], (ii) весьма широкая толерантность DRT в отношении различных модификаций природных пуринов [96, 98, 99], (iii) субстратная активность цитозина в качестве акцептора 2-дезоксид- и 2,3-дидезоксирибозидных фрагментов и соответствующих пуриновых и пиримидиновых нуклеозидов в качестве доноров углеводных остатков [100] (см. обзор [24]).

Несколько очень интересных наблюдений с точки зрения возможного практического использования DRT было сде-

лано в течение двух последних десятилетий. Так, Д.А. Карсон и Д.Б. Вассон (*D.A. Carson & D.B. Wasson*) изучили субстратную специфичность NDT *L. helveticus* (ATCC, #8018), очищенной согласно [96], и нашли, что фермент обладает широкой специфичностью как в отношении доноров углеводного фрагмента, так и пуриновых и пиримидиновых акцепторов [100]. Тестируя 2',3'-дидезокси- β -*D*-нуклеозиды (ddN) в качестве доноров углеводного фрагмента (ацетатный буфер, pH 6.0, эквимолярное соотношение донора и акцептора, 37°C), авторы обнаружили исключительно высокую активность цитозина в качестве акцептора (16–60 нмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ фермента; донорскую активность в ряду dT > ddG > ddC > ddA > ddI); а также определили донорскую активность 2',3'-дидезоксицитидина (ddC) и 3'-дезокситимидина (dT) в пределах 2.2–11.6 нмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ фермента для аденина, гуанина и гипоксантина в качестве акцепторов.

Первая рекомбинантная NDT из *L. leichmanii* (DRTII) была получена Куком и сотр. (*W.J. Cook et al.*) [101], которые изучили также биохимические свойства фермента [102–104] и архитектуру его активного центра [105]. В нативном состоянии фермент представляет собой гексамер и состоит из идентичных субъединиц, и две субъединицы образуют полный каталитический центр. Вольфенден и сотр. (*R. Wolfenden et al.*) обнаружили лиазную активность у NDT *L. leichmanii* и нашли, что промежуточное 1-*O*-глутамилпроизводное 2-дезоксид- α -*D*-рибофуранозы распадается в отсутствие гетероциклического основания с образованием *D*-рибала. Последний стереоспецифически реагирует с аденином под действием NDT *L. leichmanii*, давая 2'-дезоксидаденозин в водном растворе и его 2'- α -дейтериевое производное в D₂O (схема 13) [102]. Подобным же образом синтезировались тимидин и 2'-дезоксидуридин из *D*-рибала и соответствующих гетерооснований. Практическое использование результатов этого исследования для химико-ферментативного синтеза 2'- β -*D*-дезоксинуклеозидов не было до сих пор изучено, однако развитие работ в этом направлении представляется важным в свете доступности *D*-рибала посредством химических методов (см., напр., [106, 107]) и рекомбинантного фермента.

Схема 13



NDT — нуклеозиддеоксирибозилтрансфераза, выделенная из *Lactobacillus leichmanii*; D-рибаль (0.155 ммоль) + аденин (0.093 ммоль) + фермент (2.84 мг) в 0.1 М К-фосфатном буфере (2.9 мл, pH 5.7); 37°C. H₂O — 3 ч; D₂O — 32 ч

Следует отметить, что рекомбинантная NDT *L. leichmanii* катализирует стерео- и региоспецифичный перенос 3-азидо-2,3-дидезокси-β-D-рибофуранозы от AZT на 2-амино-6-замещенные пуриновые основания (50 мМ Na-цитратный буфер, pH 6.0; 50°C, 21–28 сут) с образованием соответствующих пуриновых N⁹-β-D-нуклеозидов с умеренным выходом. Тот же фермент был использован в качестве биокатализатора для синтеза пуриновых 4'-тионуклеозидов [104]. 2'-Дезокси-4'-тиоуридин (в виде смеси с α-аномером, полученной химическим гликозилированием урацила) был использован в качестве донора углеводного фрагмента в реакции трансгликозилирования ряда пуриновых оснований под действием NDT (50 мМ цитратный буфер, pH 6.0; 50°C, 5 сут). Индивидуальные 9-(2'-дезоксид-4'-тио-β-D-рибофуранозил)пурины были получены с выходом 5–58% после трудоемкой обработки реакционной смеси и хроматографии. Следует отметить, что тимидин- и пури-нуклеозидфосфорилазы в качестве катализаторов реакции трансгликозилирования дали негативный результат.

Идентификация глутаминовой кислоты-98 (Glu-98) в качестве нуклеофила активного центра рекомбинантной

NDT *L. leichmanii* была осуществлена Портером и сотр. (D.J.T. Porter et al.) [108]. Авторы детально изучили взаимодействие четырех пар изомерных нуклеозидов, а именно 9-(2-дезоксид-2-фтор-β-D-рибо(арабино)-фуранозил) аденинов (71) и (72), 2-амино-9-(2-дезоксид-2-фтор-β-D-рибо(арабино)фуранозил)аденинов (73) и (74), 1-(2-дезоксид-2-фтор-β-D-рибо(арабино)фуранозил)тиминов (75) и (76) и 9-(β-D-арабинофуранозил)гуанина ((21); aG). Инкубация фермента (2 мкМ) с арабинозилнуклеозидами (72), (74) или aG (каждый в концентрации 100 М) при 25°C в течение 20 мин приводила к ингибированию трансферазной активности соответственно на 91, 72 и 21%; тиминовые нуклеозиды не ингибировали фермент. Ферменты, активность которых была подавлена, содержали стехиометрическое количество ковалентно связанной 2-дезоксид-2-фтор-D-арабинозы, и их активность восстанавливалась при обработке аденином, при этом одновременно образовывался арабинозид аденина (72). Результаты протеолиза ингибированного фермента позволили предположить, что γ-карбоксильная группа глутаминовой кислоты-98 этерифицируется в процессе катализа (схема 14). Наконец, рекомбинантный фермент, Glu-98-остаток которого заменен на аланиновый, оказался на три порядка менее активным в сравнении с рекомбинантным ферментом нативной структуры.

Позднее Камински (P.A. Kaminski) получил рекомбинантные PDT и NDT *L. helveticus* и установил, что полипептиды обнаруживают 25.6% идентичности в области связывания субстрата с Glu-98 активного центра фермента [109]. Оба фермента катализировали превращение 2-аминопурина и 2,6-диаминопурина в соответствующие 2-дезоксид-β-D-рибонуклеозиды со скоростью, сравнимой с таковой для природных пуриновых оснований. 4-Аминоимидазол-5-карбоксамид (AICA) и имидазол-5-карбоксамид (ICA) оказались плохими субстратами, и их 2-деоксирибозилирование требовало больших количеств фермента и продолжительного времени инкубации. Следует отметить, что специфичная активность PDT была выше таковой

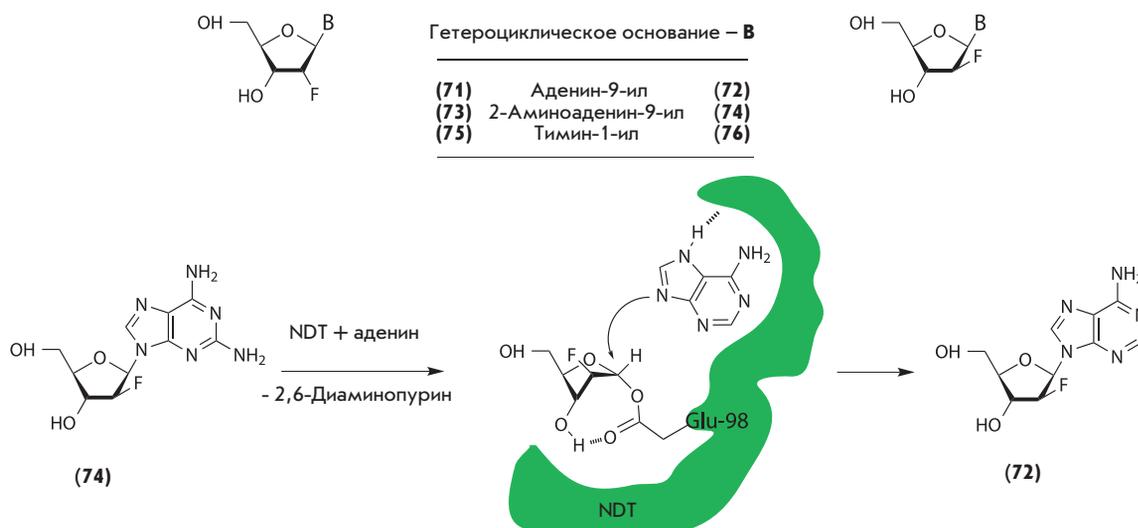


Схема 14

NDT — рекомбинантный фермент *L. leichmanii*

для NDT во всех четырех изученных реакциях трансгликозилирования (экспериментальные детали не были приведены).

Структура рекомбинантной 2'-дезоксирибозилтрансферазы *L. helveticus* (PDT) была определена рентгеноструктурным анализом [93], при этом было найдено некоторое ее подобие со структурой NDT *L. leichmanii* [105]. Было установлено, что в случае PDT *L. helveticus* нуклеофилом активного центра фермента является остаток Glu-101, который атакует гликозидный атом углерода нуклеозида, при этом атом кислорода при C3' фуранозного фрагмента участвует в образовании водородной связи с одним из атомов кислорода карбоксильной группы Glu-101 (схема 12). Гликозилированная структура PDT, образующаяся в результате инкубации фермента с арабинозидом аденина (72), содержит остаток 2-дезоксидефтор- α -D-арабинофуранозы, ковалентно связанный с другим из атомов кислорода остатка Glu-101. Сравнение структур комплексов PDT-2'-дезоксиаденозин и NDT-6-селеноинозин (в той же работе [105]) позволило объяснить специфичность PDT в отношении 2'-дезоксинуклеозидов, а именно атомы кислорода при C2' и C3' рибонуклеозида участвуют в образовании водородной связи с Glu-101, делая невозможным формирование промежуточной структуры с ковалентно связанным углеводным остатком (ср., схема 12).

Недавно Каминским и сотр. было проведено очень интересное исследование, направленное на поиск NDT с улучшенной активностью в отношении синтеза пуриновых 2',3'-дидезоксинуклеозидов [110]. Авторы сконструировали библиотеку случайных мутантов *ndt*-генов *L. leichmanii* (*Ll*) и *L. fermentum* (*Lf*) с вариабельной частотностью нуклеотидных замен (между 1 и 10 на 1 последовательность). Кроме того, авторы разработали метод функционального скрининга и провели селекцию мутантов, пригодных для синтеза 2',3'-дидезоксинуклеозидов. Оказалось, что нуклеотидная последовательность соответствующих генов содержит единичную замену (G3A), которая приводит к замене алифатической аминокислоты на кислоту, содержащую гидроксильную группу, а именно Ala15 на Thr (*L. fermentum*) или Gly9 на Ser (*L. leichmanii*). Единственная замена оказалась достаточной для усиления активности в отношении дидезоксинуклеозидных субстратов. Авторы заключили, что активность, отвечающая за перенос 2,3-дидезоксирибозильного остатка, предполагает наличие дополнительной гидроксильной группы у остатка в положении 9 (*Ll*) или 15 (*Lf*) с тем, чтобы компенсировать отсутствие такой группы в молекуле субстрата. Оба мутантных фермента обнаружили также более высокий уровень трансферазной активности в отношении 2',3'-дидегидро-2',3'-дидезокси- β -D-рибофуранозилнуклеозидов. Было установлено (без экспериментальных деталей), что *Lf*-NDT-A15T-фермент катализирует на уровне миллимоль и с хорошим выходом (до 70%) синтез 2',3'-дидегидро-2',3'-дидезоксиаденозина и 2',3'-дидегидро-2',3'-дидезоксиинозина при использовании 2',3'-дидегидро-2',3'-дидезоксиуридина (d4U) в качестве донора пентофуранозного остатка [110].

Сравнение реакций трансгликозилирования, катализируемых частично очищенным ферментом NDT *L. helveticus* [111] или пуридиннуклеозидфосфорилазой *E. coli* (Sigma),

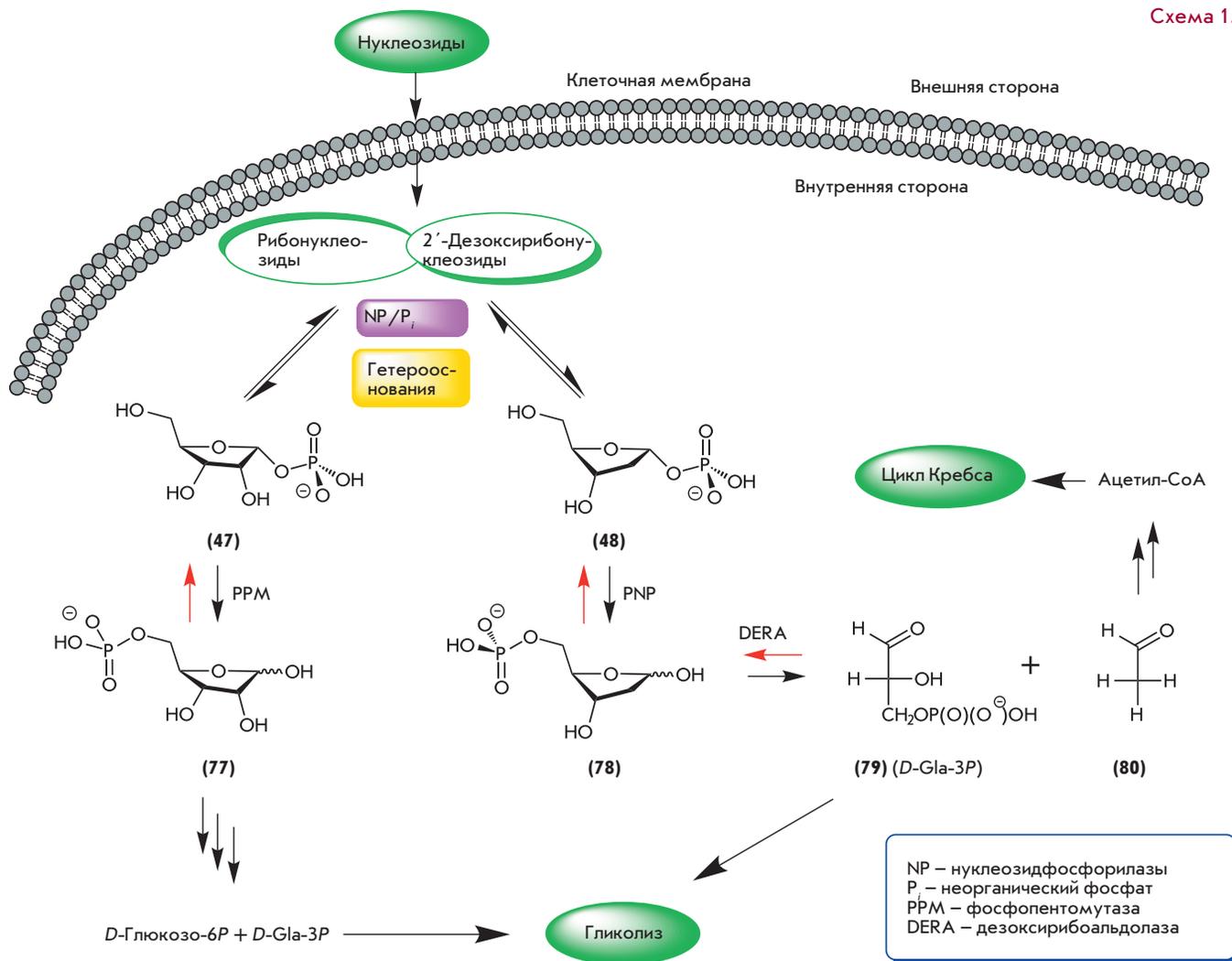
дало неожиданный результат [112, 113]. Не вдаваясь в подробности, авторы показали, что реакции, катализируемые NDT, протекают с большей региоселективностью, чем катализируемые PNP, и этот результат сильно зависит от структуры гетерооснования-акцептора (см. также [24]).

Помимо *Lactobacilli*, *N*-дезоксирибозилтрансферазы были выделены из простейших одноклеточных паразитов *Critinia lucilliae* (см., напр., [109]) и *Trypanosoma brucei* (см. [114, 115] и работы, цитированные в [114]). Фермент из *T. b. brucei* был очищен в 400 раз до >95% гомогенности из формы, паразитирующей в крови, и его свойства были изучены [79]; позднее был получен также рекомбинантный фермент [80]. В отличие от ферментов *Lactobacilli*, фермент *T. b. brucei* оказался *N*-рибо-гидролазой с рибонуклеозидгидролазной активностью преимущественно в отношении инозина, аденозина и гуанозина в качестве субстратов. Величины k_{cat}/K_m для рекомбинантного фермента и инозина, аденозина и гуанозина в качестве субстратов были определены равными соответственно ($\times 10^6$ $M^{-1} \cdot c^{-1}$) 1.6, 1.4 и 0.7. Пиримидины и 2'-дезоксинуклеозиды оказались плохими субстратами со значениями k_{cat}/K_m порядка 10^3 $M^{-1} \cdot c^{-1}$ и 10^2 $M^{-1} \cdot c^{-1}$ соответственно. 3-Дезазааденозин, 7-дезазааденозин (Туберцидин) и формицин В ингибировали фермент с константами ингибирования K_i , равными соответственно 1.8, 59 и 13 мкМ. Насколько нам известно, фермент не был использован до сих пор для синтеза нуклеозидов.

Суммируя вышеизложенное, следует подчеркнуть, что химико-ферментативная (биотехнологическая) стратегия вытесняет многостадийные химические процессы, позволяет осуществлять ключевые превращения с высокой эффективностью, регио- и стереоселективностью. Значительный прогресс в получении биологически важных аналогов природных нуклеозидов достигнут благодаря рациональной комбинации химических методов и биохимических превращений. Использование рекомбинантных нуклеозидфосфорилаз и *N*-дезоксирибозилтрансфераз в качестве биокатализаторов синтеза природных нуклеозидов и их модифицированных аналогов представляет значительный интерес для создания современных технологических процессов. Следует подчеркнуть, что обе группы ферментов удачно дополняют друг друга и позволяют найти более рациональный путь синтеза желаемого продукта. Несомненно, что использование химико-ферментативной методологии позволяет улучшить соотношение цена-качество в производстве ряда лекарств.

НОВЫЕ ТЕНДЕНЦИИ В BIOTECHNOLOGII NUKLEOZIDOV

В течение последнего десятилетия был опубликован ряд работ, которые дают новый импульс развитию биотехнологии нуклеозидов. Большое внимание уделено использованию α -D-пентофуранозо-1-фосфатов в качестве субстратов ферментативного синтеза нуклеозидов. Следует подчеркнуть, что ферментативный и химический синтезы *D*-пентофуранозо-1-фосфатов имеют богатую историю (см. [24]). Однако только в последнее время было опубликовано несколько интересных с точки зрения потенциального практического использования сообщений. В этой области следуют в первую очередь отметить два направления исследований, а именно: (i) биохимический (микробиологи-



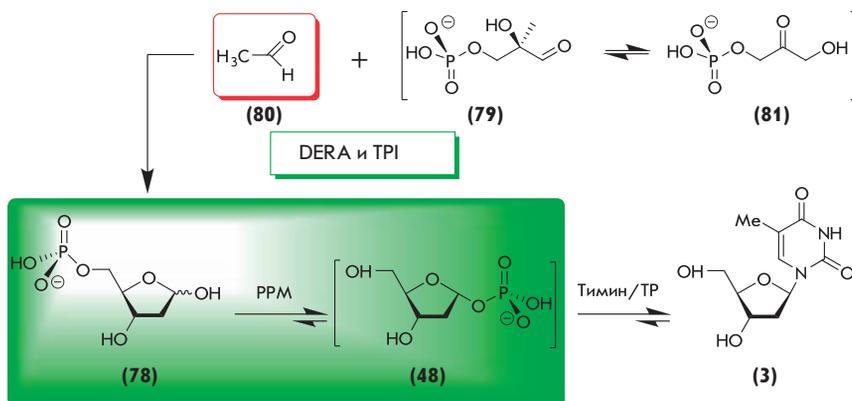
ческий, ферментативный) *ретро*-синтез 2'-дезоксирибонуклеозидов и (ii) химический синтез *D*-пентофуранозо-1-фосфатов и их последующая ферментативная конденсация с гетероциклическими основаниями.

Метаболические превращения пентоз изучены довольно обстоятельно (см., напр., обзор [116]). Нуклеозиды рассматриваются и для бактерий, и для клеток эукариот как носители углеводов, которые служат источником углерода и энергии. α -*D*-Рибофуранозо-1-фосфат (47) получается главным образом из пуриновых нуклеозидов под действием PNP; далее фосфат (47) включается в (i) гликолиз, (ii) метаболическую активацию пиримидиновых гетерооснований с образованием рибонуклеозидов (например, превращение 5-фторурацила в 5-фторуридин, катализируемое УФ) и (iii) ферментативное равновесное превращение под действием фосфопентомутазы (PPM) в *D*-рибофуранозо-5-фосфат (77), который, помимо участия в гликолизе и пентозофосфатном цикле, является предшественником 5-фосфо- α -*D*-рибофуранозил-1-пирофосфата (PRPP). Последний служит донором остатка 5-фосфо-*D*-рибофуранозы в син-

тезе нуклеозидов *de novo* и используется 5-фосфорибозил-трансферазами в «утилизации» пуриновых и пиримидиновых гетерооснований («salvage»-синтез). Катаболические превращения 2'-дезоксинуклеозидов протекают также под действием нуклеозидфосфорилаз и PPM, при этом образующийся 2-деокси-*D*-рибофуранозо-5-фосфат (78) необратимо метаболизирует далее в *D*-глицеральдегид-3-фосфат ((79); Gla-3P) и ацетальдегид (80) под действием бактериальных и эукариотических дезоксирибоальдолаз (схема 15).

Возможность реверсивного *ретро*-пути синтеза нуклеозидов, исходя из Gla-3P и ацетальдегида, была изучена Раапом и сотр. (J. Raap et al.) [117, 118]. Авторы описали двухстадийное ферментативное гликозилирование в одной колбе тимина и урацила (меченные ¹³C- и ¹⁵N-атомами) с помощью 2-деокси- α -*D*-рибофуранозо-1-фосфата ((48)); также меченного ¹³C в различных положениях) с использованием коммерческой ТР. Синтез 1-фосфата (48) был осуществлен из 2-деокси-*D*-рибофуранозо-5-фосфата (78) посредством стереоспецифичной C5 → C1-транслокации

Схема 16



DERA – D-2-дезоксирiboза-5-О-фосфатальдoлаза была выделена из суперпродуцирующего штамма *E. coli* DH5a (ATCC 89963)

TPI – триозофосфатизомеразa из пекарских дрожжей (Sigma); (81) (2.5 ммоль), ацетальдегид (200 ммоль), DERA (300 ед.) и TPI (700 ед.); инкубация при 20°C в течение 2 ч приводила к образованию (78) (2.0 ммоль)

PPM – выделена из суперпродуцирующих клеток *E. coli* и частично очищена (12 000 ед. на 84 мг белка; 1 ед. превращает 1 ммоль 5-фосфата (78) в 1-фосфат (48) за 1 мин); оптимальная активность PPM достигалась в присутствии Mn^{2+} и D-глюкозо-1,6-дифосфата

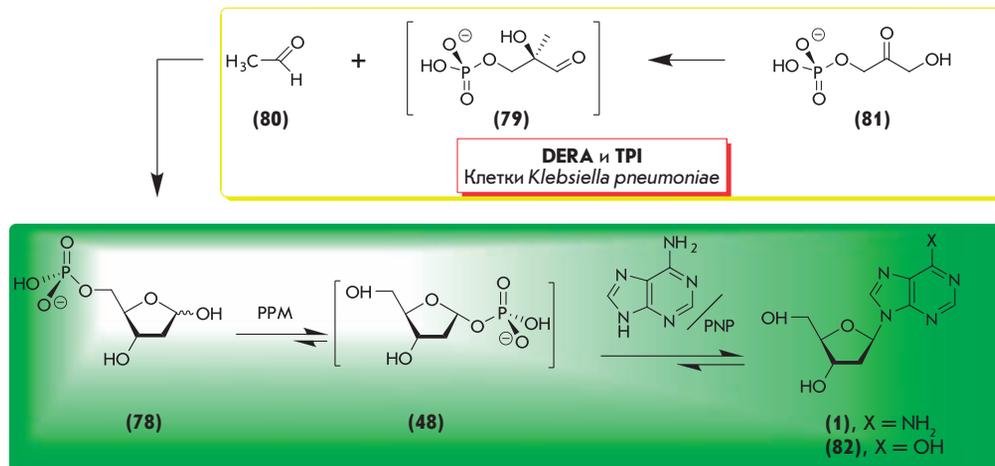
TP – тимидинфосфорилaза *E. coli* (Sigma); инкубация 5-фосфата (78) (0.1 моль) и тимина (0.4 моль) в присутствии PPM (100 ед.) и ТФ (25 ед.) при 43°C в течение 1.5 ч приводила к образованию тимидина (3) (61 ммоль; 61%)

фосфата, катализируемой частично очищенной рекомбинантной PPM. В свою очередь, ^{13}C -меченные 5-фосфаты были получены из дигидроксиацетонмонофосфата (81) в присутствии избытка ацетальдегида под действием дезоксирибоальдолазы (DERA) и коммерческой триозофосфатизомеразы (TPI, из пекарских дрожжей). Дигидроксиацетонмонофосфат был получен химическим способом. Превращение (78) → (48) и конденсацию с тиминoм или ура-

цилом проводили в одной колбе и соответствующие 2'-дезоксирибонуклеозиды были получены в индивидуальном виде с выходом 50–60% (схема 16). Следует подчеркнуть, что огромный избыток ацетальдегида был использован для того, чтобы сместить метаболическую реакцию в обратном, синтетическом направлении.

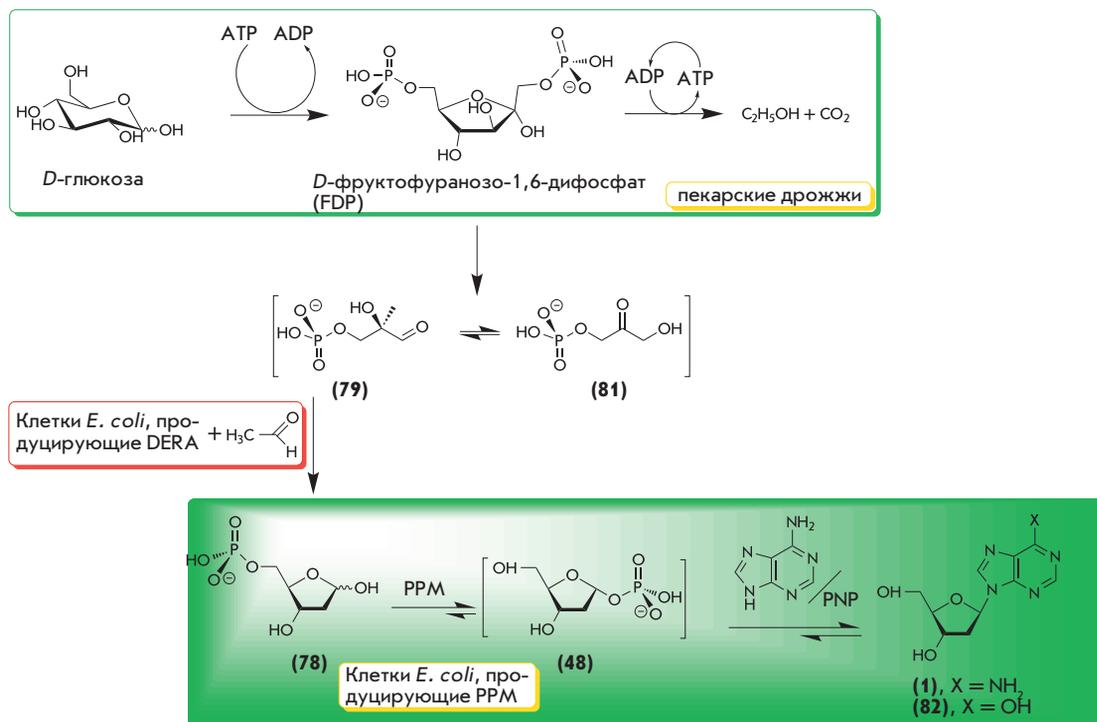
Подобный подход был использован Огавой и сотр. (*J. Ogawa et al.*) для синтеза 2'-дезоксинуклеозидов из ди-

Схема 17



TPI и DERA – триозофосфатизомеразa и D-2-дезоксирiboза-5-О-фосфат клеток *Klebsiella pneumoniae* B-4-4; инкубация (81) (117 ммоль) и (80) (200 ммоль) в присутствии отцентрифугированных клеток (16.6% по весу) при 30°C в течение 2 ч давала 5-фосфат (78) (84.3% на взятый в реакцию (81))

PPM и PNP – рекомбинантные фосфопентомутаза генетически модифицированных суперпродуцирующих клеток *E. coli* pTS17/BL21 + пури-нуклеозидфосфорилaза (Sigma) (инкубация 5-фосфата (78) (25 ммоль) и аденина при 30°C в течение 3 ч приводила к образованию (ВЭЖХ) 2'-дезоксинoзина ((82), 9.7 ммоль) и 2'-деоксиаденозина ((1), 0.6 ммоль); 2'-деоксиинозин (82) образовывался из первоначального продукта реакции 2'-деоксиаденозина (1) под действием аденозиндеаминазы (ADA), присутствующей в клетках *E. coli*)



гидроксиацетонмонофосфата и ацетальдегида через промежуточное образование 5-фосфата (78) [119, 120]. Авторы отселектировали *Klebsiella pneumoniae* B-4-4 для эффективного синтеза 5-фосфата (78), который был превращен в 1-фосфат (48) в присутствии трансформированных клеток *E. coli*, *E. coli* pTS17/BL21, продуцирующих PPM *E. coli*. Без выделения в индивидуальном виде 1-фосфат (48) вводили в конденсацию с аденином в присутствии коммерческой PNP, и в результате были получены 2'-дезоксиаденозин (1) и 2'-дезоксиинозин (82) в соотношении ≈ 1 : 16. Образование последнего в качестве основного продукта реакции объясняется присутствием в клетках *E. coli* pTS17/BL21 аденозиндезаминазы (ADA), которая дезаминирует первоначально образующийся 2'-дезоксиаденозин (1). Следует отметить, что штамм *K. pneumoniae* B-4-4 оказался толерантным к высокой концентрации ацетальдегида, смещающего обратимую реакцию, катализируемую DERA, в сторону синтеза 5-фосфата (78).

Позднее *Ogawa* и сотр. (*J. Ogawa et al.*) объединили алкогольную ферментацию пекарских дрожжей и DERA-продуцирующие клетки *E. coli* для синтеза 5-фосфата (78) [121–124]. Процедура синтеза 2'-дезоксирибонуклеозидов включала 4 стадии: 1 – в результате алкогольной ферментации дрожжей синтезируется фруктозо-1,6-дифосфат (FDP); 2 – DERA-продуцирующие клетки *E. coli* 10B5/pTS8 превращали FDP в равновесную смесь дигидроксиацетонмонофосфата (81) и *D*-глицеральдегид-3-фосфата (79); ферментативная конденсация (79) и ацетальдегида (высокая концентрация ацетальдегида необходима для предотвращения обратной реакции!) приводила к образованию 5-фосфата (78); 3 – последний превращался в 1-фосфат (48) под действием PPM-продуцирующих клеток *E. coli*

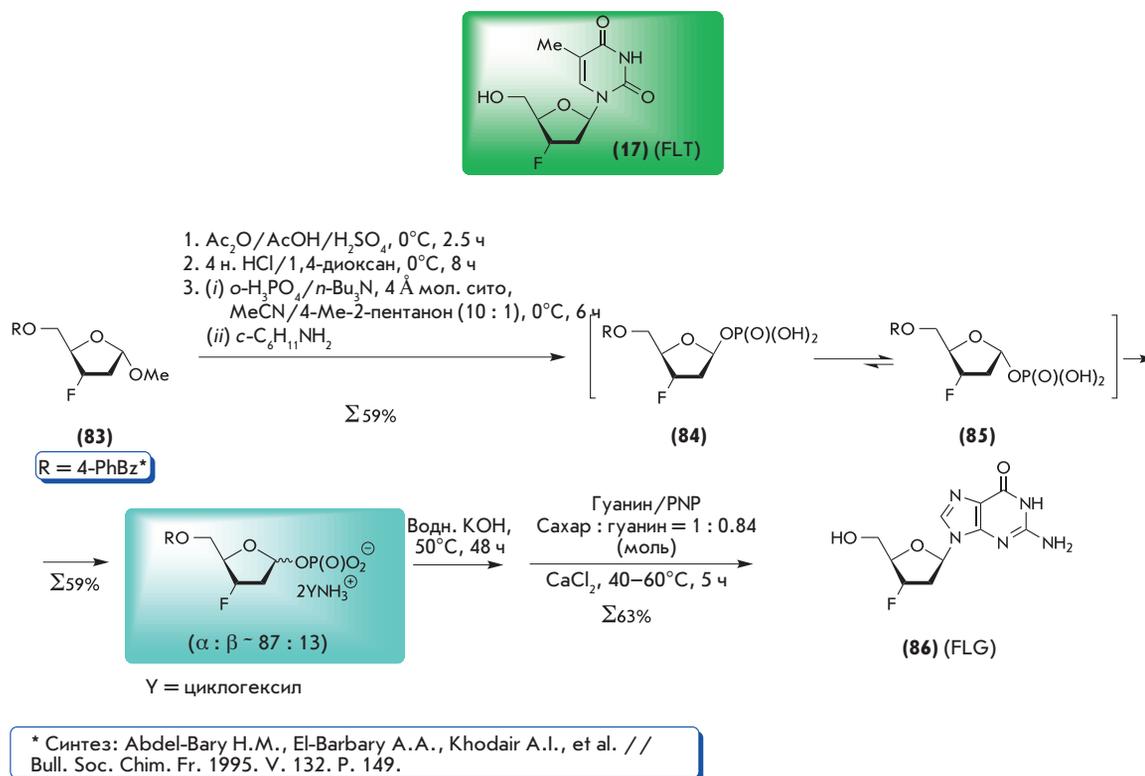
pTS17/BL21, и, наконец, стадия 4, которая проводилась в одной колбе в присутствии гетероциклического основания и при этом к реакционной смеси добавляли коммерческие препараты PNP или TP, так как активность этих ферментов в используемых клетках *E. coli* была недостаточной.

В случае синтеза 2'-дезоксиаденозина (1) также наблюдалось образование 2'-дезоксиинозина (82) в результате дезаминирования первого под действием аденозиндезаминазы использованных клеток *E. coli*. Ксилитол и полиоксипропиленлауриламмин использовали для улучшения проницаемости клеток *E. coli*, что приводило к повышению выхода 5-фосфата (78).

Следует отметить, что микробный синтез [119–124] ограничен получением 2'-деокси-β-*D*-рибонуклеозидов (выделение индивидуальных продуктов пока не описано). Кроме того, удовлетворительная растворимость гетероциклического основания в реакционной смеси является важной предпосылкой успешного синтеза нуклеозидов; так, например, очень низкая растворимость гуанина делает маловероятным синтез 2'-дезоксигуанозина. Следует также иметь в виду, что побочная ферментативная активность, присутствующая в используемых клетках, может препятствовать получению желаемого нуклеозида.

Второе направление исследований, химико-ферментативный синтез, заключается в химическом синтезе α-*D*-пентофуранозо-1-фосфатов и их последующим использованием в ферментативной конденсации с гетероциклическими основаниями. Это направление представляется более разноплановым и привлекательным для синтеза биологически важных нуклеозидов, модифицированных по углеводному фрагменту и основанию. Действительно, α-*D*-пентофуранозо-1-фосфаты являются универсаль-

Схема 19



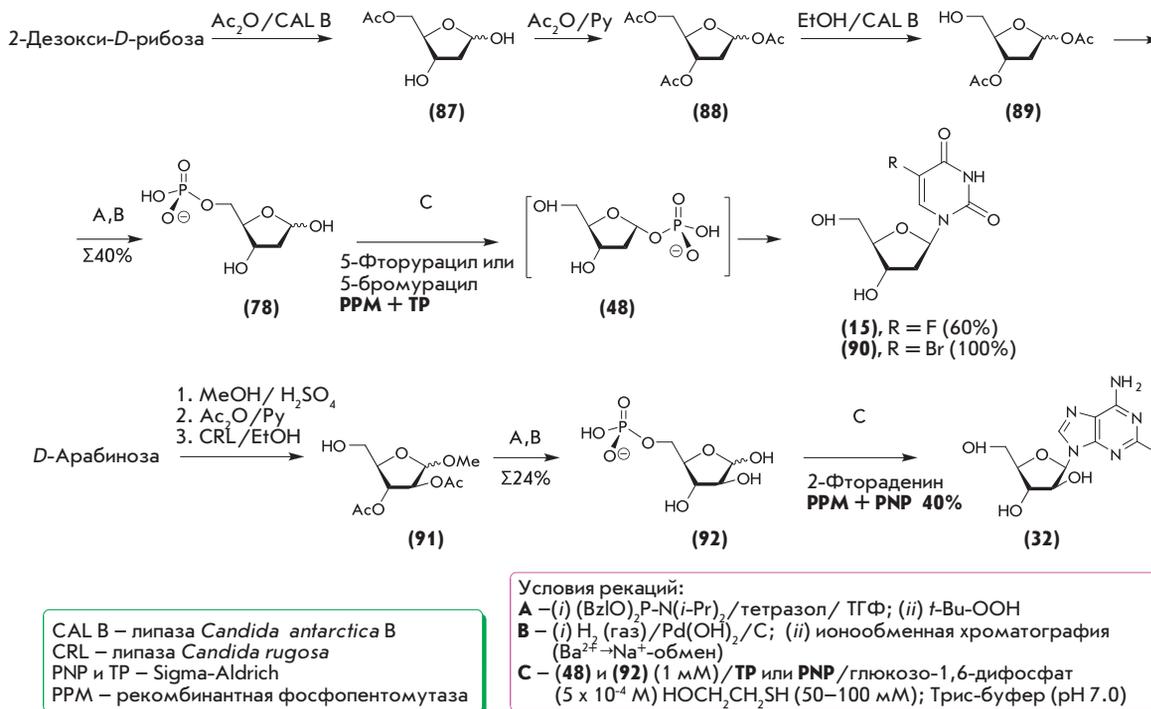
ными гликозилирующими агентами и могут быть использованы как для синтеза пиримидиновых и пуриновых нуклеозидов, так и в реакции с любыми другими гетероциклическими основаниями, которые обнаружат субстратные свойства в отношении нуклеозидфосфорилата.

Возможность реализации этой стратегии была убедительно продемонстрирована практически одновременно с обнаружением нуклеозидфосфорилата и *N*-деоксирибозилтрансфераз. В этом контексте нельзя не упомянуть пионерские исследования по фосфорилизу и ресинтезу пуриновых 2'-деоксирибозидов под действием нуклеозидфосфорилата млекопитающих [40–49], выделение 2-деокси- α -*D*-рибофуранозо-1-фосфата (48) в виде кристаллической циклогексиламмониевой соли [24, 53] и синтез тимидина и ряда 5-замещенных пиримидиновых 2'-деоксирибонуклеозидов [57, 58]. Позднее был осуществлен химический синтез α - и β -аномеров *D*-рибофуранозо-1-фосфата и 2-деокси-*D*-рибофуранозо-1-фосфата (см., напр., [24]).

Группа исследователей изучила синтез нуклеозидов конденсацией α -*D*-пентофуранозо-1-фосфатов с гетерооснованиями под действием нуклеозидфосфорилата [125–127]. Прежде всего, была разработана «индуцированная кристаллизацией асимметрическая трансформация» для стереоселективного синтеза 2-деокси- α -*D*-рибофуранозо-1-фосфата (48) и его β -*D*-аномера [125, 126]. Оба аномера были выделены в индивидуальном состоянии в виде стабильных бис(циклогексиламмониевых) солей, и однозначно было доказано, что первый является субстратом PNP, тогда как β -*D*-аномер, как и ожидалось, не обнаружил субстратной активности. 2-Дезокси- α -*D*-рибофуранозо-1-фосфат (48) был использован для синтеза 2'-деокси-2-

хлораденозина (Кладрибин) в одну стадию конденсацией с 2-хлораденином или в две стадии через промежуточное образование 9-(2-деокси- β -*D*-рибофуранозил)-2,6-дихлораденина [128]. Этот метод был затем успешно распространен на синтез 2,3-дидезокси-3-фтор-5-*O*-(4-фенил)-бензоил-*D*-рибофуранозо-1-фосфата (в виде смеси $\approx 87 : 13$ α - и β -аномеров (85) и (84)) из метил-2-деокси-*D*-рибофуранозида (83), и α -аномер этой смеси был использован после удаления 5-*O*-защитной группы в качестве ключевого субстрата PNP для синтеза 2',3'-дидезокси-3'-фторгуанозина (86) путем ферментативного гликозилирования гуанина (схема 19) [127, 129].

Данная работа имеет огромное значение для дальнейшего развития этого направления исследований, так как она дает ясный ответ на вопрос: если потенциальный нуклеозид-донор, модифицированный в углеводном фрагменте, обнаружил исключительно низкую субстратную активность в отношении нуклеозидфосфорилата и не может служить донором (например, FLT (17) в отношении TP и UP), означает ли это, что соответствующий α -*D*-пентофуранозо-1-фосфат (например, 1-фосфат 2,3-дидезокси-3-фтор- α -*D*-рибофуранозы) также будет лишен субстратных свойств в отношении нуклеозидфосфорилата. Известно, что ряд пиримидиновых нуклеозидов, легкодоступных химическими методами, не являются субстратами TP и/или UP и по этой причине не могут служить донорами пентоз. Химический синтез соответствующих α -*D*-пентофуранозо-1-фосфатов и тестирование их субстратных свойств представляет значительный интерес. Работа Komatsu и сотр. (H. Komatsu et al.) [127] дает мощный импульс развитию исследований в этом направлении.



Недавно *Монтсеррат* и сопр. (*J.M. Montserrat et al.*) описали химико-ферментативный синтез нуклеозидов из *D*-рибозы, 2-дезоксид-*D*-рибозы и *D*-арабинозы [130]. Пентозы были превращены в 5-фосфаты (в виде натриевых солей) химическими методами с использованием в некоторых случаях липаз для введения/удаления защитных групп. Совместное действие PPM, которая катализирует превращение 5-фосфатов в 1-фосфаты, и конденсация последних с гетерооснованиями в присутствии PNP или TP приводили к образованию соответствующих нуклеозидов (схема 20).

Работа *Монтсеррат* и сопр. представляет значительный интерес как пример рационального химико-ферментативного синтеза *D*-пентофуранозо-5-фосфатов (ср., например, с данными работ [118, 119, 121–123]). В первую очередь следует отметить универсальность подхода

к синтезу *D*-пентофуранозо-5-фосфатов, так как использование липаз для региоселективного введения и удаления ацетильных защитных групп не лимитируется, по-видимому, изученными пентозами.

Значительный интерес представляет синтез 9-(2-дезоксид-2-фтор-β-*D*-арабинофуранозил)пуринов, описанный в работе *Ямада* и сопр. (*K. Yamada et al.*) [131, 132]. В этом случае отсутствуют простые и надежные методы синтеза потенциального донора углеводного фрагмента, и поэтому химический синтез 2-дезоксид-2-фтор-α-*D*-арабинофуранозо-1-фосфата (96) и его использование в качестве универсального гликозилирующего агента представляет резонную альтернативу химическому гликозилированию гетерооснований (схема 21). Исходным соединением служила коммерчески доступная

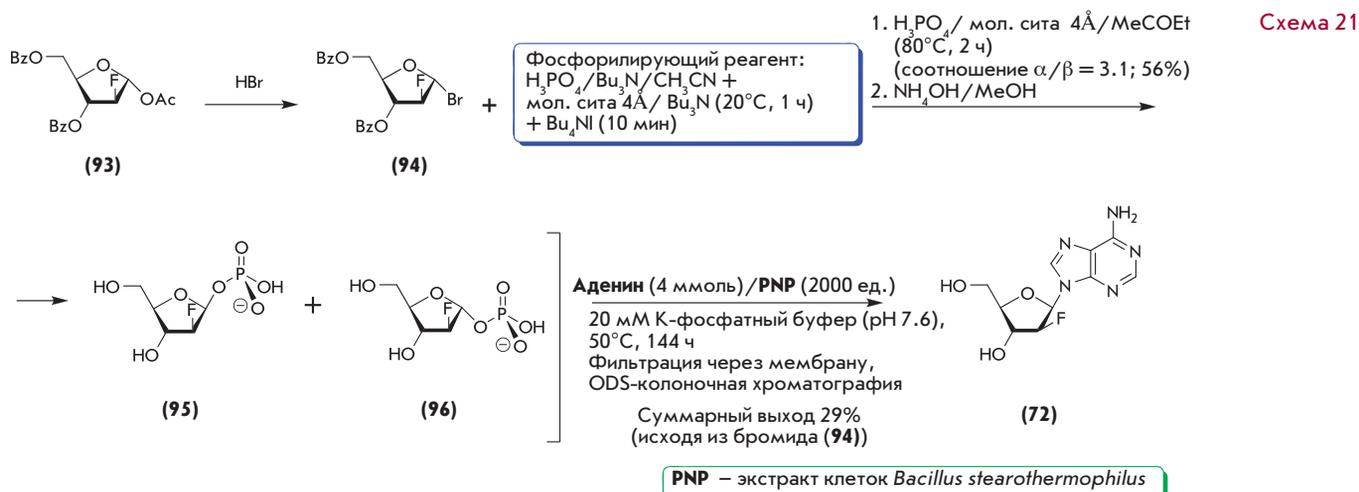
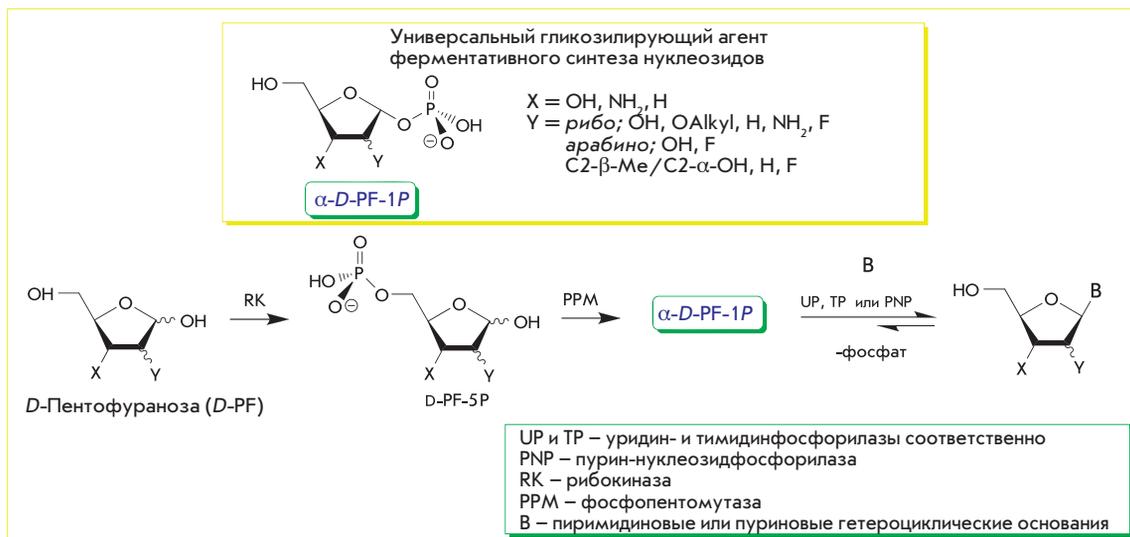


Схема 22



1-О-ацетил-3,5-ди-О-бензоил-2-дезоксид-2-фтор- α -D-арабинофураноза (**93**), которая была превращена в бромид (**94**) и далее в смесь $\approx 3 : 1$ α - и β -фосфатов (**96**) и (**95**). Эта смесь без выделения в индивидуальном виде α -аномера (**96**), который является субстратом PNP, была использована в синтезе N⁹-пуриновых 2-дезоксид-2-фтор- β -D-арабинофуранозилнуклеозидов с удовлетворительным выходом. Следует иметь в виду, что химическое гликозилирование приводит в ряде случаев к образованию смесей аномеров (пурины и пиримидины) и региоизомеров (пурины) [11, 12].

Анализ приведенных выше результатов приводит к выводу, что узким местом этой стратегии получения нуклеозидов является трудоемкий и малоэффективный синтез α -D-пентофуранозилфосфатов. Однако, несмотря на это, данная стратегия получения биологически важных нуклеозидов представляет несомненный интерес и может служить ценным дополнением к рассмотренным выше химико-ферментативным методам.

Недавно нами была предложена новая стратегия синтеза нуклеозидов, которая состоит в последовательном превращении пентоз в нуклеозиды в присутствии гетерооснований под действием рекомбинантных ферментов *E. coli*, а именно рибозкиназы (RK) (*D*-пентоза \rightarrow *D*-пентозо-5-фосфат (*D*-PF-5P)), фосфопентомутаза (PPM) (*D*-PF-5P \rightarrow α -*D*-пентофуранозо-1-фосфат (*D*-PF-1P)) и нуклеозидфосфорилазы (NP) (*D*-PF-1P + гетерооснование \rightarrow нуклеозиды) (схема 22) [133].

Получение рекомбинантной RK, а также уридин- (UP), тимидин- (TP) и пуриин-нуклеозидфосфорилаз (PNP) было описано нами ранее [134]. Было найдено, что RK катализирует в оптимальных условиях фосфорилирование первичной гидроксильной группы не только *D*-рибозы и 2-дезоксид-*D*-рибозы, но и *D*-арабинозы и *D*-ксилозы. Эти данные говорят о возможности использования RK в качестве биокатализатора первой стадии каскадного превращения пентоз в нуклеозиды. Стереоспецифичная C5 \rightarrow C1-транслокация фосфата под действием PPM является резонным мостом в предложенной нами стратегии превра-

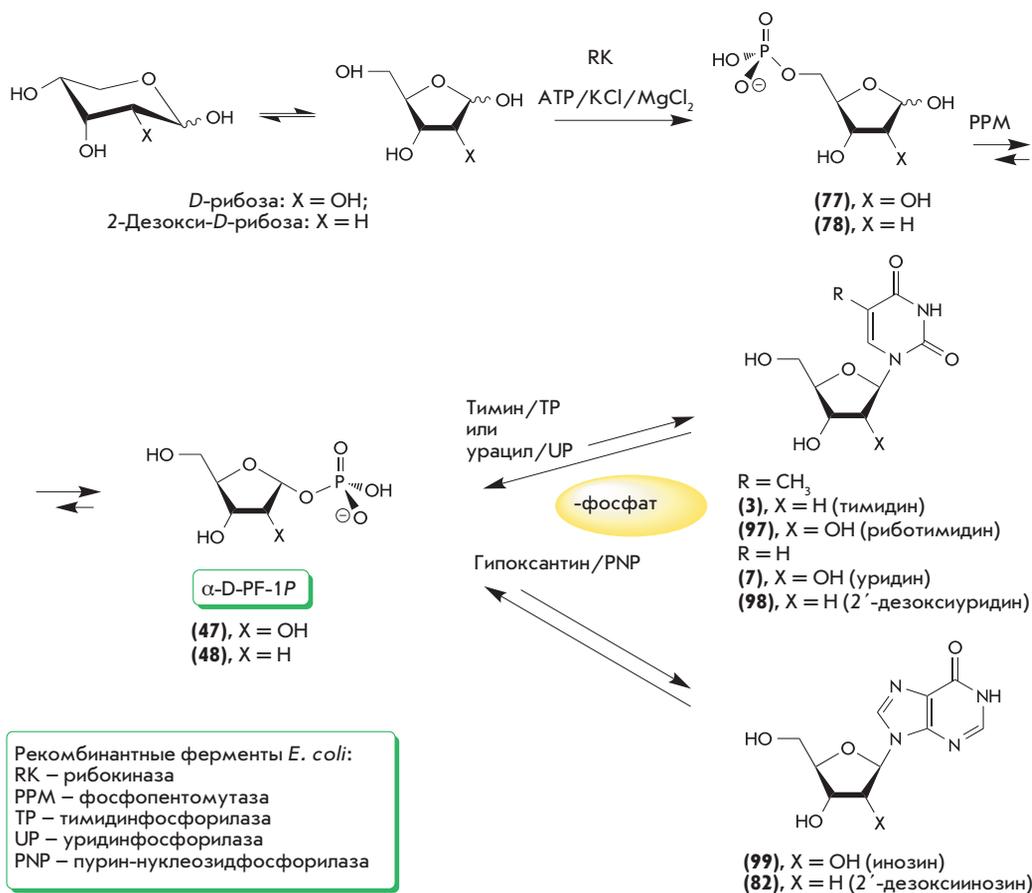
щения пентоз в нуклеозиды, и это обстоятельство побудило нас получить рекомбинантную PPM и тестировать возможность практической реализации идеи. Предварительные результаты превращения *D*-рибозы или 2-дезоксид-*D*-рибозы в пиримидиновые и пуриновые нуклеозиды под действием очищенных рекомбинантных *E. coli* RK, PPM и нуклеозидфосфорилаз были недавно опубликованы (схема 23) [135].

Анализ оптимальных условий реакции с участием RK [133], PPM и NP [134] обнаружил существенные различия. Принимая это во внимание, были выбраны компромиссные условия каскадного превращения пентоз в нуклеозиды в одной колбе, которые позволяют удовлетворительно функционировать всем используемым ферментам, а именно: общий объем реакционной смеси 2 мл; состав буферного раствора: 2 мМ ATP, 50 мМ KCl, 3 мМ MnCl₂, 20 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 2 мМ пентоза, 2 мМ гетерооснование; температура реакции 20°C; ферменты (в соответствующих единицах): RK 7.65; PPM 3.9; TP 4.5; UP 5.4; PNP 4.68. Результаты превращения *D*-рибозы и 2-дезоксид-*D*-рибозы в пиримидиновые и пуриновые нуклеозиды представлены на схеме 23 и в табл. 1.

Таблица 1. Образование нуклеозидов в каскадном ферментативном синтезе в одной колбе при 20°C (содержание соответствующего нуклеозида (%)) в реакционной смеси в определенный отрезок времени)

Время реакции, ч	Инозин (99)	2'-Дезокси-инозин (82)	Тимидин (3)/2'-дезоксид-уридин (98)*	1-(β -D-Рибофуранозил)-тимин (97) / уридин (7)*
0.5	45.9	18.8	14.5/0.9	4.7/27.6
1	46.1	27.3	17.6/1.1	8.5/26.6
24	38.4	38.3	-	-
44	-	-	34.7/33.2	19.9/17.5
96	29.4	34.4	-	-

*Тимидинфосфорилаза (TP) и уридинфосфорилаза (UP) были использованы в синтезе нуклеозидов тимина и урацила соответственно.



Примечательно, что образование инозина происходит быстрее в сравнении с образованием $2'$ -дезоксйинозина и достигает максимального выхода через 30 мин. Следует отметить, что синтез $2'$ -дезоксйрибонуклеозидов пуринов и их аналогов протекал со значительно большей эффективностью в условиях реакции трансгликозилирования в сравнении с синтезом рибонуклеозидов [82–84]. Очевидно, что изученные условия каскадного превращения пентоз в нуклеозиды требуют тщательной оптимизации с тем, чтобы добиться высоких выходов желаемых продуктов. На примере синтеза Кладрибина (**31**) нами было показано, что при соотношении субстратов 2 -дезоксй- D -рибозы и 2 -хлораденина (**100**) 1.5 : 1 (моль/моль) желаемый про-

дукт образовывался с выходом более 90% (схема 24) [136].

Как уже отмечалось выше, химический синтез α - D -пентофуранозо-1-фосфатов достаточно сложен для того, чтобы эти соединения нашли широкое применение для получения препаративных количеств нуклеозидов. Предварительные результаты каскадного превращения пентоз в нуклеозиды под действием трех ферментов говорят о целесообразности более детального изучения этой стратегии с целью определения области возможного применения и ограничений.

Анализ химических методов получения пенто(гексо)-фуранозо-1-фосфатов [125–132, 137–147], а также различные методы активации аномерного атома углерода (см.

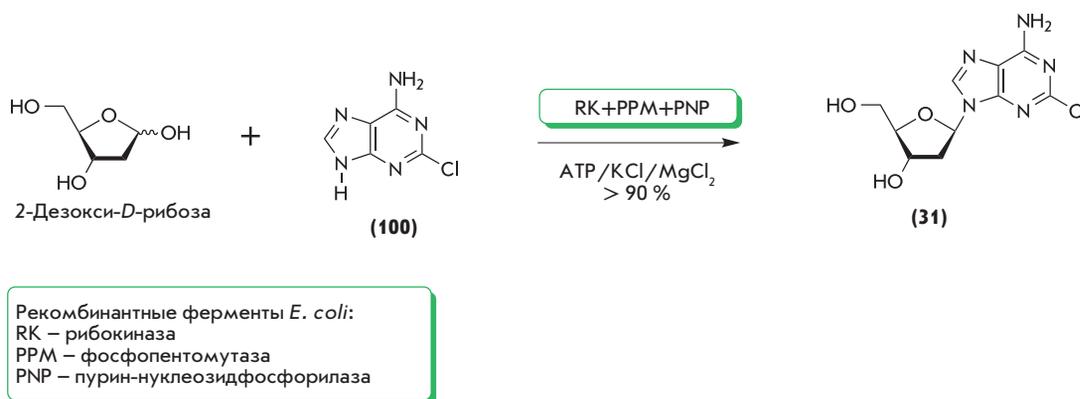
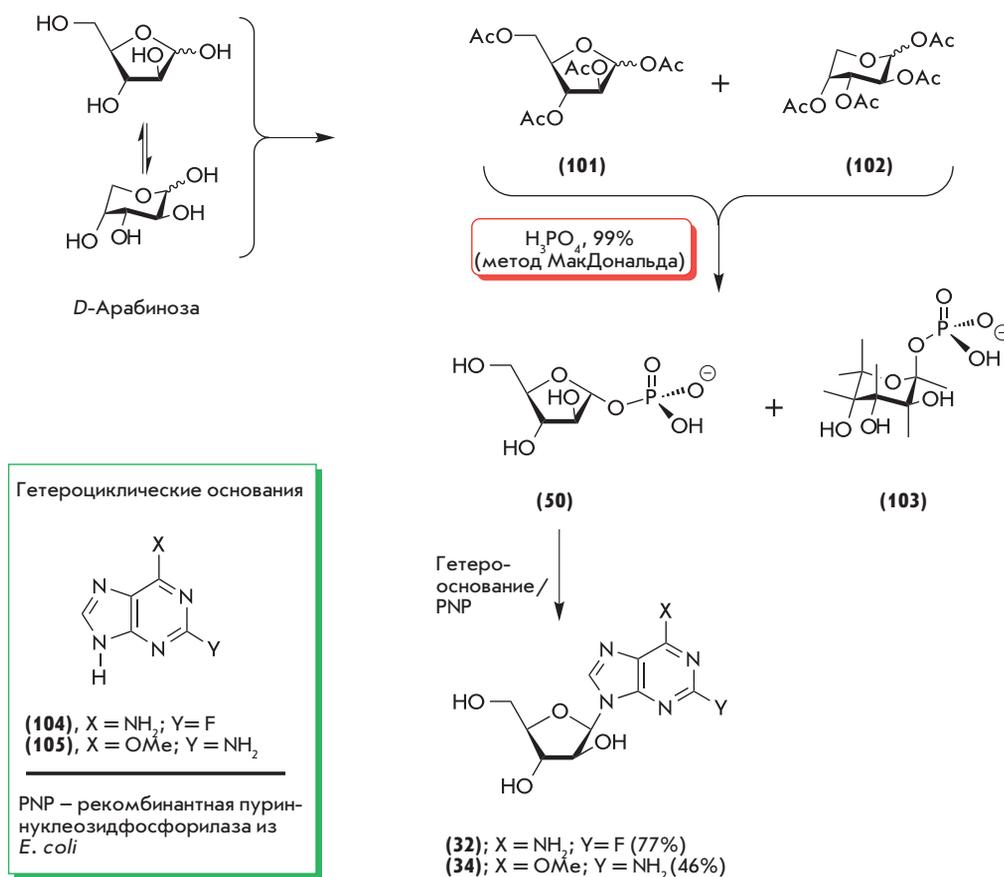


Схема 25



обзор [139]) показывает, что большинство из них трудоемки и приводят к получению желаемых фосфатов с низкими выходами. Как можно было ожидать, в основном наблюдалось образование смесей аномеров, и только, по-видимому, уникальная «асимметрическая трансформация, индуцированная кристаллизацией» приводит к преимущественному образованию желаемых 2-деокси- α -D-пентофуранозо-1-фосфатов [85].

Будучи относительно простым, метод, предложенный МакДональдом (*D.L. MacDonald*) [140–144], представляется наиболее эффективным и побудил нас применить его для синтеза α -D-пентофуранозо-1-фосфатов. Следует отметить, что метод МакДональда показал свою эффективность в синтезе гексопиранозо-1-фосфатов и только в работе Аспиналла и сотр. (*G.O. Aspinall et al.*) он был использован для получения α -L-арабинофуранозо-1-фосфата: выдерживание перацетилпроизводного L-арабинофуранозы (смесь α, β -аномеров) в безводной фосфорной кислоте и безводном THF при 50°C в течение 2 ч давало после обработки реакционной смеси смесь L-арабинофуранозо-1-фосфата (преимущественно α -L-аномер) и L-арабинопиранозо-1-фосфата (оба в виде циклогексилламмониевых солей) с суммарным выходом 19% [147]. Следует отметить, что убедительных физико-химических данных в пользу указанных структур не было представлено.

Принимая во внимание, что большое число пуриновых и пиримидиновых β -D-арабинофуранозидов проявляют

высокую противовирусную и противоопухолевую активность (см. выше, а также [18, 19, 148–150]), мы обратились к синтезу D-арабинофуранозо-1-фосфата по МакДональду и использовали его для синтеза пуриновых нуклеозидов. Свежеполученный тетраацетат D-арабинозы представлял смесь α, β -аномеров фуранозной (101) и пиранозной (102) форм (ср., [151]), и его обработка по МакДональду приводила к образованию аморфной смеси α -D-арабинофуранозо-1-фосфата (50) и β -D-арабинопиранозо-1-фосфата (103) ($\approx 50\%$ суммарный выход; соотношение изомеров от 1.5 : 8 до 1 : 2, согласно ¹H-ЯМР). Эта смесь была протестирована в реакции с 2-фтораденином (104) и 2-амино-6-метоксипурином (105), катализируемой рекомбинантной PNP *E. coli*.

Было найдено, что 1-фосфат пиранозной формы (102) не ингибирует в оптимальных условиях (водный раствор, pH 7.0, 55°C; 1 ч) синтез 9-(β -D-арабинофуранозил)-2-фтораденина ((32); Флударабин), который был выделен с 77% выходом (схема 25) [152]. Неожиданным представляется тот факт, что скорость образования Флударабина была подобна скорости синтеза 2-фторадеозина из α -D-рибофуранозо-1-фосфата (Sigma) и 2-фтораденина (104) в присутствии рекомбинантной PNP *E. coli*.

Высокая скорость образования Флударабина оказалась неожиданной (ср., [130]). С химической точки зрения, конденсация α -D-пентофуранозо-1-фосфатов с гетерооснованиями происходит в результате нуклеофильной атаки ато-

Таблица 2. Результаты оптимизации пространственной структуры $\alpha(\beta)$ -D-пентофураноза(пираноза)-1-фосфатов (в виде моносодиевых) солей методом *ab initio* (HyperChem, 8.1; *in vacuo*, 6-31G* уровень)

Соединение	Положительный парциальный заряд на C1-атоме	Полная энергия образования, ккал/моль	Конформация пентофуранозного (пиранозного) кольца
(47); Ribf- α 1P	0.425	-808 850.3	C1- <i>exo</i>
(48); dRibf- α 1P	0.454	-762 140.7	C3- <i>endo</i>
(50); Araf- α 1P	0.464	-808 841.6	O4- <i>exo</i>
	0.410	-808 868.5	4C_1 (более стабильна)
(103); Araf- β 1P	0.451	-808 856.8	4C_1 (менее стабильна)

ма азота гетерооснования на электрофильный аномерный атом углерода 1-фосфата. Для того чтобы оценить электрофильные свойства C1-атома, мы использовали метод *ab initio* для оптимизации структуры ряда близких по строению фосфатов, а именно 1-фосфатов α -D-рибофуранозы ((47); Ribf- α 1P), α -D-2-дезоксирибофуранозы ((48); dRibf- α 1P) и ((50); Araf- α 1P) (табл. 2). Из данных табл. 2 следует, что положительные заряды C1-атомов 2-дезоксирибо- и арабино-фосфатов близки по величине и выше, чем заряд рибо-изомера. Последний, у которого *цис*-расположение фосфатной функции и C2-гидроксила, является более стабильным в сравнении арабино-фосфатом. Пространственные структуры рибо- и 2-дезоксирибо-фосфатов предпочтительны для нуклеофильной атаки, и C2-гидроксил арабино-изомера создает незначительные стерические препятствия подходу основания к C1-атому [152].

Различия в положительном парциальном заряде C1-атомов рибо- и 2-дезоксирибо-фосфатов согласуются с более эффективным транс-дезоксирибо-зилированием в сравнении с транс-рибо-зилированием дезазагуринов [24, 82] и бензимидазолов [24, 83, 84]. Подобная субстратная активность Ribf- α 1P и Araf- α 1P в реакции с 2-фтораденином объясняется, по-видимому, взаимодействием двух факторов: большим парциальным положительным зарядом C1-атома Araf- α 1P, с одной стороны, и негативным стерическим влиянием C2-гидроксила, с другой (ср. с данными работы [130]).

Следует отметить, что расчеты говорят о более высокой термодинамической стабильности обоих конформеров β -D-арабинопиранозо-1-фосфата, а именно 4C_1 и 4C_1 , в сравнении с Araf- α 1P. Эти различия, по-видимому, объясняют преимущественное образование пиранозного фосфата в реакции МакДональда.

В отличие от 2-фтораденина, реакция 2-амино-6-метоксипурина (105) и Araf- α 1P (в виде смеси с Araf- β 1P) в присутствии рекомбинантной PNP *E. coli* в описанных выше условиях достигала равновесия при эквимолярном соотношении исходного гетерооснования и продукта реакции, 2-амино-9-(β -D-арабинофуранозил)-6-метоксипурина ((34); Неларабин), который был выделен с выходом 44%.

Этот результат согласуется с ранее описанным синтезом Неларабина с выходом 53% трансарабинозилированием 2-амино-6-метоксипурина (105), использующим 1-(β -D-арабинофуранозил)урацил (49) в качестве донора углеводного фрагмента и UP и PNP *E. coli* в качестве биокатализаторов [153].

Ранее нами было найдено, что транс-2-дезоксирибозилирование N^2 -ацетилгуанина с тимидином или 2'-дезоксигуанозином в качестве доноров углеводного остатка и соответственно TP/PNP или PNP в качестве биокатализаторов первоначально приводит к образованию N^2 -ацетил-7-(2-дезоксид- β -D-рибофуранозил)гуанина, который постепенно перегруппировывается в термодинамически более стабильный N^2 -ацетил-9-(2-дезоксид- β -D-рибофуранозил)гуанин [76]. В описанных выше синтезах Флударабина и Неларабина мы не наблюдали подобного течения реакции. Этот результат позволяет предположить, что электронная структура гетероциклического основания определяет тип связывания гетерооснования в активном центре PNP, что обуславливает региоселективность ферментативной реакции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ результатов химико-ферментативного синтеза нуклеозидов убедительно показывает высокую эффективность этой методологии, которая представляет интерес для создания биотехнологических процессов получения биологически важных соединений. Гликозилрование гетероциклических оснований катализируется двумя типами ферментов: нуклеозидфосфорилазами и N -дезоксирибоз-илтрансферазами; указанные ферменты проявляют различную субстратную специфичность и поэтому взаимно дополняют друг друга с точки зрения их использования в качестве биокатализаторов.

В целом, изложенные выше результаты демонстрируют очевидные преимущества химико-ферментативных методов синтеза нуклеозидов в сравнении с химическими. Во-первых, ферментативные методы полностью отвечают принципам «зеленой химии», так как, как правило, не используют агрессивных реагентов (ацетальдегид – исключение) и органических растворителей. Во-вторых, высокая эффективность ферментативных превращений и стерео- (только β -D-нуклеозиды!) и региоселективность (исключение – отдельные специфические случаи) упрощают процессы выделения желаемых соединений и повышают их качество. Все это вместе взятое приводит к снижению затрат на производство биологически важных соединений, делает их доступными для широкого изучения, а лекарственные средства – для широкого применения. ●

Авторы выражают благодарность Международному научному и технологическому центру (МНТЦ, проект № В-1640) за финансовую поддержку настоящего исследования. И.А. Михайлопуло глубоко признателен Фонду Александра фон Гумбольдта (Бонн – Бад-Годесберг, Германия) за постоянное внимание и частичную финансовую поддержку.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Levene P.A., Tipson R.S. // *J. Biol. Chem.* 1935. V. 111 (2). P. 313–323.
2. Levene P.A., Mandel H. // *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* 1908. V. 41 (2). P. 1905–1909.
3. Levene P.A., Jacobs W.A. // *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* 1909. V. 42 (2). P. 2469–2473.
4. Levene P.A., Jacobs W.A. // *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* 1909. V. 42 (2). P. 2474–2478.
5. Levene P.A., Jacobs W.A. // *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* 1911. V. 44 (1). P. 746–753.
6. Levene P.A., London E.S. // *J. Biol. Chem.* 1929. V. 83 (2). P. 793–802.
7. Levene P.A., Mori T. // *J. Biol. Chem.* 1929. V. 83 (2). P. 803–816.
8. Fischer E., Helferich B. // *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* 1914. V. 47 (1). P. 210–235.
9. Gulland J.M., Story L.F. // *J. Chem. Soc.* 1938. P. 259–261.
10. Michelson A.M. *The chemistry of nucleosides and nucleotides.* London: Acad. Press, 1963. 600 p.
11. Lukevics E., Zablocka A. *Nucleoside Synthesis: Organosilicon Methods.* Chichester: Ellis Horwood, 1991. 496 p.
12. Vorbrüggen H., Ruh-Pohlenz C. // *Organic reactions* / Eds Paquette L.A. et al. New York: Wiley, 2000. V. 55. P. 1–630.
13. Bardos Th.J. // *Topics Curr. Chem.* 1974. V. 52. P. 63–98.
14. Langen P. *Antimetabolites of nucleic acid metabolism.* New York: Gordon and Breach, 1975. 273 p.
15. Suhadolnik R.J. // *Progr. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* 1979. V. 22. P. 193–291.
16. De Clercq E. // *J. Med. Chem.* 2010. V. 53 (4). P. 1438–1450.
17. De Clercq E. // *Med. Res. Rev.* 2009. V. 29 (4). P. 611–645.
18. *Modified nucleosides in biochemistry, biotechnology and medicine* / Ed. Herdewijn Piet. Wiley-VCH, 2008. 900 p.
19. Famulok M., Hartig J.S., Mayer G. // *Chem Rev.* 2007. V. 107. P. 3715–3743.
20. Elion G.B. // *Science.* 1989. V. 244. P. 41–46.
21. Gandhi V., Plunkett W. // *Curr. Opin. Oncol.* 2006. V. 18. P. 584–590.
22. Bonate P.L., Arthaud L., Cantrell, Jr., W.R., et al. // *Nature Rev. Drug Discov.* 2006. V. 5. P. 855–863.
23. De Clercq E. // *Intern. J. Antimicrob. Agents.* 2009. V. 33. P. 307–320.
24. Mikhailopulo I.A. // *Current Org. Chem.* 2007. V. 11. P. 317–335.
25. Montgomery J.A. // *J. Med. Chem.* 1980. V. 23 (10). P. 1063–1067.
26. Montgomery J.A. // *Heterocycles.* 1984. V. 21 (1). P. 137–150.
27. De Clercq E. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2002. V. 1. P. 13–25.
28. Ftorafur. An anticancer drug. (Pamphlet) / Compiled by Germane S., et al. Riga: Zinatne, 1979. 358 p.
29. Buie L.B., Epstein S.S., Lindley C.M. // *Clin. Therapeutics.* 2007. V. 29 (9). P. 1887–1899.
30. De Clercq E. // *Nature Rev. Drug Discovery.* 2007. V. 6. P. 1001–1018.
31. De Clercq E. // *Antiviral Res.* 2010. V. 85 (1). P. 19–24.
32. De Clercq E. // *Adv. Virus Res.* 2009. V. 73. P. 1–53.
33. Ferir G., Kaptein S., Neyts J., De Clercq E. // *Rev. Med. Virol.* 2008. V. 18. P. 19–34.
34. Vivet-Boudou V., Didierjean J., Isel C., Marquet R. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2006. V. 63. P. 163–186.
35. Schaeffer H.J., Bhargava P.S. // *Biochemistry.* 1965. V. 4 (1). P. 71–76.
36. Schaeffer H.J., Vince R. // *J. Med. Chem.* 1965. V. 8 (1). P. 33–35.
37. Schaeffer H.J., Gurwara S., Vince R., Bittner S. // *J. Med. Chem.* 1971. V. 14 (4). P. 367–369.
38. Schaeffer H. J., Beauchamp L., de Miranda P., et al. // *Nature.* 1978. V. 272. P. 583–585.
39. De Clercq E., Holy A. // *Nature Rev. Drug Discovery.* 2005. V. 4. P. 928–940.
40. Levene P.A., Medigreceanu F. // *J. Biol. Chem.* 1911. V. 9 (3). P. 375–387.
41. Levene P.A., Medigreceanu F. // *J. Biol. Chem.* 1911. V. 9 (3). P. 389–402.
42. Levene P.A., Yamagawa M., Weber I. // *J. Biol. Chem.* 1924. V. 60 (3). P. 693–706.
43. Levene P.A., Weber I. // *J. Biol. Chem.* 1924. V. 60 (3). P. 707–715.
44. Levene P.A., Weber I. // *J. Biol. Chem.* 1924. V. 60 (3). P. 717–720.
45. Jones W. // *J. Biol. Chem.* 1911. V. 9 (2). P. 129–137.
46. Jones W. // *J. Biol. Chem.* 1911. V. 9 (2). P. 169–180.
47. Levene P.A., Yamagawa M., Weber I. // *J. Biol. Chem.* 1924. V. 60 (3). P. 693–706.
48. Levene P.A., Weber I. // *J. Biol. Chem.* 1924. V. 60 (3). P. 707–715.
49. Levene P.A., Weber I. // *J. Biol. Chem.* 1924. V. 60 (3). P. 717–720.
50. Bzowska A., Kulikowska E., Shugar D. // *Pharm. Ther.* 2000. V. 88. P. 349–425.
51. Kalckar H.M. // *Federation Proc.* 1945. V. 4. P. 248–250.
52. Kalckar H.M. // *J. Biol. Chem.* 1947. V. 167 (2). P. 477–486.
53. Manson L.A., Lampen J.O. // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193 (2). P. 539–547.
54. Araki T., Ikeda I., Matoishi K., et al. *Eur. Pat. Appl.* 2002, 32 p. CODEN: EPXXDW EP 1254959 A2 20021106 CAN 137:348820 AN 2002:847552 CAPLUS
55. Usowa E., Maltseva T., Földesi A., et al. // *J. Mol. Biol.* 2004. V. 344. P. 1347–1358.
56. Lewkowics E.S., Iribarren A.M. // *Curr. Org. Chem.* 2006. V. 10 (11). P. 1197–1215.
57. Friedkin M., Roberts D. // *J. Biol. Chem.* 1954. V. 207 (1). P. 245–256.
58. Friedkin M., Roberts D. // *J. Biol. Chem.* 1954. V. 207 (1). P. 257–266.
59. Duschinsky R., Plevan E., Rlalbica J., Heidelberger C. // *Abstracts, 132nd National Meeting of the American Chemical Society.* New York, 1957. P. 19–C.
60. Duschinsky R. *US Patent* 3,168,513 (1965).
61. Hoffer M., Duschinsky R., Fox J.J., Yung N. // *J. Am. Chem. Soc.* 1959. V. 81 (15). P. 4112–4113.
62. Hoffer M. // *Chem. Ber.* 1960. V. 93. P. 2777–2781.
63. Heidelberger C., Parsons D.G., Remy D.C. // *J. Am. Chem. Soc.* 1962. V. 84 (18). P. 3597–3598.
64. Heidelberger C., Parsons D.G., Remy D.C. // *J. Med. Chem.* 1964. V. 7. P. 1–5.
65. Friedkin M., Kalckar H.M. // *The Enzymes, 2nd ed.* / Eds Boyer P.D., Lardy H., Myrbäck K. New York: Acad. Press, 1961. V. 5. P. 237–255.
66. Heidelberger C., Ansfield F.J. // *Cancer Res.* 1963. V. 23. P. 1226–1243.
67. Heidelberger C. // *Progr. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol.* 1965. V. 4. P. 1–50.
68. Heidelberger C. // *Annu. Rev. Biochem.* 1975. V. 44. P. 79–121.
69. Kalinichenko E.N., Barai V.N., Bokut S.B., et al. // *Biotechnol. Lett.* 1989. V. 11. P. 621–626.
70. Tuttle J.V., Tisdale M., Krenitsky T.A. // *J. Med. Chem.* 1993. V. 36. P. 119–125.
71. Tuttle J.V., Krenitsky T.A. *EP 0285432 B1* (Wellcome Found, GB), *Publ.* 1988–10–05.
72. Zinchenko A.I., Barai V.N., Bokut S.B., et al. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1990. V. 32. P. 658–661.
73. Zaitseva G.V., Zinchenko A.I., Barai V.N., et al. // *Nucleosides Nucleotides.* 1999. V. 18. P. 687–688.
74. Zaitseva G.V., Kvasnyuk E.I., Vaaks E.V., et al. // *Nucleosides Nucleotides.* 1994. V. 13. P. 819–834.
75. Esipov R.S., Gurevich A.I., Chuvikovskiy D.V., et al. // *Protein Expes. Purif.* 2002. V. 24. P. 56–60.
76. Roivainen J., Elizarova T., Lapinjoki S., et al. // *Nucleosides, Nucleotides, & Nucleic Acids.* 2007. V. 26. P. 905–909.
77. Bzowska A., Kulikowska E., Shugar D. // *Z. Naturforsch.* 1990. V. 45c. P. 59–70.
78. Koellner G., Bzowska A., Wielgus-Kutrowska B., et al. // *J. Mol. Biol.* 2002. V. 315. P. 351–371.
79. Krenitsky T.A., Rideout J.L., Koszalka G.W., et al. // *J. Med. Chem.* 1982. V. 25. P. 32–35.
80. Krenitsky T.A., Rideout J.L., Chao E.Y., et al. // *J. Med. Chem.* 1986. V. 29. P. 138–143.
81. Hennen W.J., Wong C.-H. // *J. Org. Chem.* 1989. V. 54. P. 4692–4695.
82. Mikhailopulo I.A., Zinchenko A.I., Bokut S.B., et al. // *Biotechnol. Lett.* 1992. V. 14 (10). P. 885–890.
83. Mikhailopulo I.A., Kazimierzczuk Z., Zinchenko A.I., et al. // *Nucleosides Nucleotides.* 1995. V. 14 (3–5). P. 477–480.
84. Mikhailopulo I.A., Kazimierzczuk Z., Zinchenko A.I., et al. // *Nucl. Acids Symp. Ser. № 31.* 1994. P. 83–84.
85. Doskocil J., Holy A. // *Coll. Czech. Chem. Commun.* 1977. V. 42. P. 370–383.

86. Rosemeyer H., Seela F. // *J. Org. Chem.* 1987. V. 52. P. 5136–5143.
87. Colacino J. M., DeLong D. C., Nelson J. R., et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1990. V. 34. P. 2156–2163.
88. Ehlhardt W.J., Wheeler W.J., Breau A.P., et al. // *Drug Metabolism Disposition.* 1993. V. 21. P. 162–170.
89. Hayden F.G., Tunkel A.R., Treanor J.J., et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1994. V. 38. P. 1178–1181.
90. Ling F., Inoue Y., Kimura A. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1990. V. 56 (12). P. 3830–3834.
91. Shirae H., Yokozeki K. // *Agric. Biol. Chem.* 1991. V. 55 (7). P. 1849–1857.
92. Cardinaud R. // *Methods Enzymol.* 1978. V. 51. P. 446–455.
93. Anand R., Kaminski P.A., Ealick S.E. // *Biochemistry.* 2004. V. 43. P. 2384–2393.
94. McNutt W.S. // *Biochem. J.* 1952. V. 50. P. 384–397.
95. Roush A.H., Betz R.F. // *J. Biol. Chem.* 1958. V. 233. P. 261–266.
96. Beck W.S., Levin M. // *J. Biol. Chem.* 1963. V. 238. P. 702–709.
97. Holguin L., Cardinaud R. // *Eur. J. Biochem.* 1975. V. 54. P. 505–514.
98. Huang M.-C., Hatfield K., Roetker A.W., et al. // *Biochem. Pharmacol.* 1981. V. 30. P. 2663–2671.
99. Holguin L., Cardinaud R., Salemink C.A. // *Eur. J. Biochem.* 1975. V. 54. P. 515–520.
100. Carson D.A., Wasson D.B. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988. V. 155. P. 829–834.
101. Cook W.J., Short S.A., Ealick S.E. // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. P. 2682–2683.
102. Smar M., Short S.A., Wolfenden R. // *Biochemistry.* 1991. V. 30. P. 7908–7912.
103. Freeman G.A., Shaver S.R., Rideout J.L., Short S.A. // *Bioorg. Med. Chem.* 1995. V. 3. P. 447–458.
104. van Draanen N.A., Freeman G.A., Short S.A., et al. // *J. Med. Chem.* 1996. V. 39. P. 538–542.
105. Armstrong S.R., Cook W.J., Short S.A., Ealick S.E. // *Structure.* 1996. V. 4. P. 97–107.
106. Cheng J.C.-Y., Hacksell U., Daves G.D., Jr. // *J. Org. Chem.* 1985. V. 50 (15). P. 2778–2780.
107. Walker J.A., II, Chen J.J., Wise D.S., Townsend L.B. // *J. Org. Chem.* 1996. V. 61 (6). P. 2219–2221.
108. Porter D.J.T., Merrill B.M., Short S.A. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270 (26). P. 15551–15556.
109. Kaminski P.A. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 14400–14407.
110. Kaminski P.A., Dacher P., Dugue L., Pochet S. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. P. 20053–20059.
111. Uerkvitz W. // *Eur. J. Biochem.* 1971. V. 23. P. 387–395.
112. Chapeau M.-C., Marnett L.J. // *Chem. Res. Toxicol.* 1991. V. 4. P. 636–638.
113. Müller M., Hutchinson L.K., Guengerich F.P. // *Chem. Res. Toxicol.* 1996. V. 9. P. 1140–1144.
114. Parkin D.W. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271 (6). P. 21713–21719.
115. Pelle R., Schramm V.L., Parkin D.W. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273 (4). P. 2118–2126.
116. Tozzi M.G., Camici M., Mascia L., et al. // *FEBS J.* 2006. V. 273. P. 1089–1101.
117. Ouwerkerk N., van Boom J.H., Lugtenburg J., Raap J. // *Eur. J. Org. Chem.* 2000. V. 5. P. 861–866.
118. Ouwerkerk N., Steenweg M., De Ruijter M., et al. // *J. Org. Chem.* 2002. V. 67. P. 1480–1489.
119. Ogawa J., Saito K., Sakai T., et al. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2003. V. 67. P. 933–936.
120. Ishige T., Honda K., Shimizu S. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2005. V. 9. P. 174–180.
121. Horinouchi N., Ogawa J., Kawano T., et al. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006. V. 71. P. 615–621.
122. Horinouchi N., Ogawa J., Kawano T., et al. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2006. V. 70. P. 1371–1378.
123. Horinouchi N., Ogawa J., Kawano T., et al. // *Biotechnol. Letters.* 2006. V. 28. P. 877–881.
124. Horinouchi N., Kawano T., Sakai T., et al. // *New Biotechnol.* 2009. V. 26 (1/2). P. 75–82.
125. Komatsu H., Awano H., Tanikawa H., et al. // *Nucleosides Nucleotides Nucl. Acids.* 2001. V. 20. P. 1291–1293.
126. Komatsu H., Awano H. // *J. Org. Chem.* 2002. V. 67. P. 5419–5421.
127. Komatsu H., Awano H., Ishibashi H., et al. // *Nucl. Acids Res. Suppl.* № 3. 2003. P. 101–102.
128. Komatsu H., Araki T. // *Nucleosides Nucleotides Nucl. Acids.* 2005. V. 24 (5–7). P. 1127–1130.
129. Komatsu H., Araki T. // *Tetrahedron Lett.* 2003. V. 44. P. 2899–2901.
130. Taverna-Porro M., Bouvier L.A., Pereira C.A., et al. // *Tetrahedron Lett.* 2008. V. 49. P. 2642–2645.
131. Yamada K., Matsumoto N., Hayakawa H. // *Nucl. Acids Symp. Ser. No. 48.* 2004. P. 45–46.
132. Yamada K., Matsumoto N., Hayakawa H. // *Nucleosides Nucleotides Nucl. Acids.* 2009. V. 28. P. 1117–1130.
133. Chuvikovskiy D.V., Esipov R.S., Skoblov Y.S., et al. // *Bioorg. Med. Chem.* 2006. V. 14. P. 6327–6332.
134. Esipov R.S., Gurevich A.I., Chuvikovskiy D.V., et al. // *Protein Expres. Purif.* 2002. V. 24. P. 56–60.
135. Mikhailopulo I.A., Konstantinova I.D., Fateev I.V., et al. // *The 2nd International Conference on Drug Discovery & Therapy: Abstracts.* Dubai, 2010. P. 123. (ICDDT_AbstractBook.pdf, p. 123).
136. Miroschnikov A.I., Esipov R.S., Konstantinova I.D., et al. // *Nucleosides Nucleotides Nucl. Acids.* 2010. In press.
137. de Lederkremer R.M., Nahmad V.B., Varela O. // *J. Org. Chem.* 1994. V. 59. P. 690–692.
138. Euzen R., Ferrieres V., Plusquellec D. // *J. Org. Chem.* 2005. V. 70. P. 847–855.
139. Hanessian S., Lou B. // *Chem. Rev.* 2000. V. 100. P. 4443–4463.
140. MacDonald D.L. // *J. Org. Chem.* 1962. V. 27. P. 1107–1109.
141. MacDonald D.L. // *Carbohydr. Res.* 1966. V. 3. P. 117–120.
142. MacDonald D.L. // *Carbohydr. Res.* 1968. V. 6. P. 376–381.
143. Mendicino J., Hanna R. // *J. Biol. Chem.* 1970. V. 245. P. 6113–6124.
144. Chittenden G.J.F. // *Carbohydr. Res.* 1972. V. 25. P. 35–41.
145. Wright R.S., Khorana H.G. // *J. Am. Chem. Soc.* 1958. V. 80. P. 1994–1998.
146. Maryanoff B.E., Reitz A.B., Nortey S.O. // *Tetrahedron.* 1988. V. 44. P. 3093–3106.
147. Aspinall G.O., Cottrell I.W., Matheson N.K. // *Can. J. Biochem.* 1972. V. 50. P. 574–580.
148. Larson R.A. // *Seminars Oncol.* 2007. V. 34 (Suppl. 5). P. S13–S20.
149. Gandhi V., Plunkett W. // *Curr. Opin. Oncol.* 2006. V. 18. P. 584–590.
150. Bonate P.L., Arthaud L., Cantrell, Jr., W.R., et al. // *Nature Rev. Drug Discov.* 2006. V. 5. P. 855–863.
151. Kobayashi M. // *Tetrahedron.* 2002. V. 58. P. 9365–9371.
152. Konstantinova I.D., Antonov K.V., Fateev I.V., et al. // *Nucleosides Nucleotides Nucl. Acids.* 2010. In press.
153. Averett D.R., Koszalka G.W., Fyfe J.A., et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1991. V. 35. P. 851–857.

УДК 612.741.91

Сократительная активность скелетной мышцы и судьба миоядер

Б. С. Шенкман*, О. В. Туртикова, Т. Л. Немировская, А. И. Григорьев

ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва

*E-mail: shenkman@imbp.ru

Поступила в редакцию 28.12.2009 г.

РЕЗЮМЕ Зрелое скелетное мышечное волокно является симпластом – многоядерной структурой, образованной в онтогенезе путем слияния клеток-предшественников, миобластов. Ядра мышечного волокна (миоядра) располагаются на его периферии в пространстве, находящемся между миофибриллами и сарколеммой, клеточной мембраной. Теоретически масса скелетной мышцы при разгрузке или нагрузке может меняться за счет изменения количества миоядер, скорости процессов транскрипции, трансляции и интенсивности протеолиза. В этом обзоре рассматриваются данные, накопленные в мировой литературе, относящиеся к феноменологии и предполагаемым механизмам изменения количества ядер мышечных волокон при повышенной и пониженной сократительной активности. В ряде случаев (при тяжелых мышечных и системных заболеваниях и при гравитационной разгрузке) мышечная атрофия сопровождается уменьшением количества ядер в мышечном волокне. Редукцию миоядерного числа обычно объясняют развитием ядерного апоптоза в мышечных волокнах. Появление новых ядер в волокне может быть обеспечено только клетками-миосателлитами при их слиянии с мышечным волокном. Считается, что именно они обеспечивают мышечное волокно дополнительными ядрами для роста в постнатальный период, а также при рабочей гипертрофии и участвуют в восстановлении и локальной регенерации мышечных волокон после повреждения. В обзоре рассматриваются возможные механизмы, регулирующие пролиферацию клеток-миосателлитов в условиях нагрузки, функциональной разгрузки и пассивного растяжения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА скелетная мышца, миоядра, апоптоз, физическая тренировка, рабочая гипертрофия, клетки-миосателлиты, ростовые факторы, гравитационная разгрузка, растяжение.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ IGF (insulin-like growth factor) – инсулиноподобный фактор роста, AIF – апоптозиндуцирующий фактор, GFP – зеленый флуоресцирующий белок, BrdU – бромдезоксисуридин, c-Met – рецептор для HGF, HGF – фактор роста гепатоцитов, FGF – фактор роста фибробластов, MMPs – матриксные металлопротеиназы, MGF – механозависимый фактор роста.

ВВЕДЕНИЕ

Скелетная мышца – одна из наиболее пластичных структур в организме млекопитающих. Повышенная активность и нагруженность мышцы часто приводят к увеличению ее поперечных размеров (толщины), увеличению объема миофибриллярного аппарата, значительному повышению его сократительных возможностей (силы, мощности). В основе такой перестройки лежит устойчивое изменение паттерна экспрессии генов.

Хроническое снижение функциональной нагрузки на постуральные мышцы, и прежде всего *m. soleus*, при длительном изменении действия гравитационных сил (переход в горизонтальное положение, устранение опоры на все или только задние конечности, пребывание в условиях невесомости), которое принято называть гравитационной разгрузкой, приводит к глубокой перестройке всей структурно-функциональной организации мышечной ткани [1–3]. Среди наиболее важных проявлений гипогравитационной перестройки мышц – снижение сократительных возможностей (силы и работоспособности), снижение жесткости мышцы и ее волокон, значительное уменьшение

объема ядерного, миофибриллярного аппарата и размеров волокна (атрофия), разрастание соединительно-тканых и экстрацеллюлярных структур, изменение миозинового фенотипа волокон в сторону увеличения экспрессии быстрых изоформ тяжелых цепей миозина. Данные последних лет позволяют считать, что в основе гравитационно-зависимой перестройки волокон *m. soleus* лежит стабильное направленное изменение экспрессии большого числа генов, формирование нового целостного, т.н. атрофического, паттерна экспрессии.

Зрелое мышечное волокно является симпластом, многоядерной структурой, образованной в онтогенезе путем слияния клеток-предшественников, миобластов. Ядра мышечного волокна располагаются на его периферии в пространстве, находящемся между миофибриллами и сарколеммой, клеточной мембраной. В мышечной ткани имеются и другие ядра, принадлежащие фибробластам, эндотелиальным клеткам, клеткам-предшественникам (миосателлитам). Поэтому в литературе собственные ядра мышечных волокон принято называть миоядрами. Теоретически масса скелетной мышцы при разгрузке или нагрузке мо-

жет меняться за счет изменения количества миоядер, скорости процессов транскрипции, трансляции и интенсивности протеолиза. В этом обзоре будут рассматриваться данные, накопленные в мировой литературе, относящиеся к феноменологии и предполагаемым механизмам изменения количества ядер мышечных волокон при повышенной и пониженной сократительной активности.

Ядра зрелых мышечных волокон являются постмитотическими и не способны к делению. Количество миоядер очень важно, поскольку оно определяет количество ДНК, необходимой для поддержания транскрипции генов [4]. Взаимотношение между размером волокон и числом миоядер легло в основу концепции миоядерного домена, которая впервые предложена в работах Cheek и соотр. [5]. Миоядерный домен представляет собой объем цитоплазмы мышечного волокна, управляемый продуктами экспрессии генов одного миоядра. Несмотря на то, что понятие ядерного домена довольно условно и очевидно, что экспрессия генов, распределение белков по мышечному волокну зависит от множества переменных, этим понятием удобно пользоваться при описании механизмов пластичности мышц. Во многих работах анализируется не сам домен, а площадь поперечного сечения волокна, приходящаяся на одно миодро.

Для выявления миоядер обычно используют традиционные ядерные красители, специфически связывающие ДНК. Основная проблема, с которой сталкиваются исследователи, определяющие количественные показатели ядерного пула мышечного волокна, состоит в том, что при анализе поперечных срезов мышечной ткани без применения специальных приемов оказывается невозможным отличить ядра, находящиеся по разные стороны границы волокна. Для решения этой проблемы применяют различные подходы. В частности, используют двойную одновременную окраску (double labeling) ядер и специфических белков субсарколеммального слоя, например дистрофина [6]. Многие авторы анализируют ядерный состав изолированного мышечного волокна [7, 8]. При анализе изолированного волокна приходится иметь дело с объемной структурой, что делает необходимым использование конфокального лазерного микроскопа. Такой подход имеет очевидные преимущества: можно анализировать весь ядерный пул волокна (а не только ядра, попадающие в плоскость поперечного среза), можно проследить распределение плотности ядер по длине волокна и его элементарной единицы – саркомера. Однако размер выборки волокон оказывается в этом случае весьма ограниченным (20–30 волокон на биопробу).

Allen с соавт. была выдвинута гипотеза постоянства миоядерного домена при изменении размеров мышечных волокон (атрофии и гипертрофии) [4]. Они выявили, что размеры миоядерного домена неизменны во время острой стадии гипертрофии. Пропорциональное увеличение количества миоядер и объема цитоплазмы при гипертрофии было обнаружено в исследованиях на модели функциональной гипертрофии, вызванной удалением мышц-синергистов [9]. Этим же коллективом авторов была показана вариабельность размеров миоядерного домена при хроническом увеличении или уменьшении нагрузки на собаках [10] и уменьшение его размеров при атрофии у крыс [7]. Гипотеза постоянства миоядерного домена, таким образом, оказалась несостоятельной и в дальнейшем была опровер-

гнута многочисленными исследованиями в условиях разгрузки и тренировки [11–13, 8]. Установлено, что размер миоядерного домена меняется в течение жизни животного [14–16]. Недавние исследования итальянских авторов еще раз подтвердили возможность гипертрофии без инкорпорации новых миоядер, т.е. увеличение миоядерного домена при гипертрофии [11].

РЕДУКЦИЯ МИОЯДЕРНОГО ЧИСЛА

В ряде случаев (при тяжелых мышечных и системных заболеваниях и при гравитационной разгрузке) мышечная атрофия сопровождается уменьшением количества миоядер на волокно при соответствующем развитии апоптотических процессов в миодрах. Такая редукция миоядерного числа наблюдалась в четырехглавой мышце астронавтов после космического полета [17], в камбаловидной мышце крыс после космического полета [10, 12], при моделировании разгрузки на крысах с использованием т.н. вывешивания задних конечностей [18, 19], при иммобилизации камбаловидной мышцы. Потери миоядер наиболее интенсивны в медленных волокнах [19]. В исследованиях на единичных волокнах установлено снижение размеров миоядерного домена после разгрузки в *m. soleus*, но не в *m. plantaris* у крыс [12]. Миоядерный домен также имел тенденцию к снижению после 14-суточного космического полета у макак резус [20]. Wang с соавт. показали, что после 16 дней вывешивания у крыс уменьшается площадь поперечного сечения волокон *m. soleus*, число миоядер (на 25 %) и размер ядерного домена [21].

Редукцию миоядерного числа обычно объясняют развитием ядерного апоптоза в мышечных волокнах. Процессы апоптоза в мышечных волокнах развиваются несколько иначе, нежели в других клеточных типах. Ультраструктурные признаки деструкции ядра при изменении сократительной активности обычно слабо выражены. В то же время разрывы ДНК в ядре сопровождаются рядом митохондриальных и внемитохондриальных событий, которые принято считать звеньями взаимозависимых сигнальных путей, обуславливающих апоптотические процессы.

Апоптотические ядра в волокнах скелетных мышц наблюдали при дистрофии Дюшена (и на ее биологической модели – животных линии mdx) [22], при поражении мышц на фоне хронической сердечной недостаточности, развитии бокового амиотрофического склероза и в ряде других случаев. Апоптоз миоядер также наблюдали и после специфического вида физических нагрузок, т.н. эксцентрической работы [23]. При таком состоянии напряжение мышечного волокна развивается на фоне его растяжения. Это сокращение вызывает многочисленные деструктивные изменения цитоскелетных белков и сарколеммы. В 1997 г. в работе Allen и др. впервые сообщалось о присутствии апоптотических ядер при вывешивании крыс [18]. У крыс максимальное число апоптотических ядер в волокнах *m. soleus* (судя по окраске TUNEL, выявляющей разрывы ДНК) наблюдалось уже на 2-е сут после инактивации камбаловидной мышцы [24]. Аналогичные данные были получены и в экспериментах с мышцами, у которых максимальные значения содержания апоптозинулирующего фактора (AIF) и экспрессии p53 наблюдались уже после 24 ч разгрузки [25]. Этому предшествовало резкое увеличение концентрации

каспазы-3 и каспазы-8 уже после 12 ч вывешивания. А повышенная концентрация Bcl-2 выявлялась даже после 6 ч разгрузки. При экспозициях более суток наблюдаемые проявления апоптоза снижались. Сходную динамику выявляли и при иммобилизации *m. soleus* [24]. При восстановлении после вывешивания задних конечностей уже на 7-е сут проявления апоптоза практически не обнаруживались [26]. Некоторые авторы не обнаруживали активации каспазного каскада в *m. soleus* при вывешивании или спинальной изоляции [27], отмечая в то же время в этих экспериментальных ситуациях транслокацию в ядро эндонуклеазы G, фермента митохондриального происхождения, осуществляющего деградацию ядерной ДНК. Недавно группа авторов подвергла животных вывешиванию при пониженной температуре, что по их замыслу должно было значительно замедлить развитие митохондриально-зависимых процессов. В этом случае также наблюдались апоптотические ядра и значительная активация каспаз [28].

Как уже отмечалось выше, при однократной физической нагрузке в мышечном волокне наблюдаются различные проявления апоптоза (фрагментация ДНК, повышенная активность каспаз и др.), однако регулярная физическая тренировка не только снижает эти проявления апоптоза, но и обладает антиапоптотическим действием в отношении ядерных изменений, развивающихся при пониженной мышечной активности [18].

В отличие от других клеточных структур, в волокнах скелетной мышцы апоптоз отдельных ядер не приводит к немедленной гибели волокна, хотя не может проходить без очевидных патологических последствий.

В последнее время Bruusgaard и др. [29] подвергли сомнению весь комплекс многократно описанных наблюдений ядерных потерь и апоптоза в условиях атрофии. Они проводили трансфекцию мышцей плазмидой, кодирующей GFP, который локализовался в миоядрах, а затем проводили анализ количества миоядер при денервации и разгрузке *m. extensor digitorum longus* (вызванной теномомией антагонистов) в течение длительного времени (14 дней). На фоне значительного снижения площади поперечного сечения мышечных волокон авторы не обнаруживали какого-либо уменьшения числа миоядер. Зафиксированные апоптотические изменения наблюдались лишь в клетках-сателлитах и клетках соединительной ткани, но отсутствовали внутри мышечного волокна. Аналогичные данные были получены другими авторами при исследовании детренировки мышц крыла японского перепела: все ядра, демонстрировавшие признаки апоптоза, оказались также мечеными индикатором синтеза ДНК бромдезоксисуридином (BrdU), т.е. оказались ядрами клеток-сателлитов [30]. В то же время Bruusgaard и Gundersen [29] основывают свои выводы на экспериментах с денервацией, разгрузкой и блокадой проведения нервного импульса к мышцам с преобладанием быстрых волокон, которые менее подвержены апоптозу (см. выше). Эти авторы не ставят под сомнение данные (приведенные выше), свидетельствующие об апоптозе и редукции миоядерного числа при моделировании действия микрогравитации методом антигравитационного вывешивания задних конечностей животных (и соответственно результаты аналогичных экспериментов с участием добровольцев). Они предполагают, что в этом случае апоптозу миоядер

способствуют системные проявления гравитационной разгрузки. К сожалению, приходится констатировать, что это предположение пока не находит экспериментального подтверждения.

Увеличение количества ядер в зрелом мышечном волокне наблюдалось в условиях силовой тренировки, экспериментальной рабочей гипертрофии (при удалении мышечных синергистов) и при восстановлении после атрофических процессов [26, 31–33]. Появление новых ядер в волокне может быть обеспечено только клетками-миосателлитами при их слиянии с мышечным волокном. Считается, что именно они обеспечивают мышечное волокно дополнительными ядрами для роста в постнатальный период и участвуют в восстановлении и локальной регенерации мышечных волокон после повреждения [34].

КЛЕТКИ-ПРЕДШЕСТВЕННИКИ В СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЕ. МАРКЕРЫ МИОСАТЕЛЛИТНЫХ КЛЕТОК

Клетки-сателлиты в скелетной мышце – это мелкие одоядерные клетки, которые остаются в состоянии покоя (фазе G₀ клеточного цикла) до момента активации, после чего они начинают пролиферировать и могут сливаться с мышечными волокнами, являясь необходимым источником миоядер в постэмбриональном развитии, при гипертрофии и восстановлении ткани [12], или друг с другом при формировании новых мышечных волокон [16]. Предположительно, сателлиты – это покоящиеся в мышечной ткани миообласты. Существует мнение, что сателлиты происходят от эндотелиальных предшественников, ассоциированных с васкулатурой эмбриона, которые могут оставаться в интерстициальном пространстве скелетных мышц и экспрессировать CD 34 [35]. Однако количество миогенных предшественников в скелетной мышце превышает число клеток-сателлитов вследствие миграции или рекрутирования недифференцированных стволовых клеток из других источников. Показано, что популяция клеток-предшественников, представленных в скелетной мускулатуре, происходит от некоммутированных мезенхимальных клеток-предшественников костного мозга и отличается от сателлитных клеток. Это клетки т.н. сторонней популяции; в отличие от популяции сателлитных клеток они экспрессируют Sca-1 и CD-45. Они, очевидно, принимают участие в регенерации мышцы после повреждения и после трансплантации в мышцу потенциально могут давать рост как миоцитам, так и клеткам-миосателлитам [36, 37]. Миосателлиты могут быть идентифицированы в мышце по их расположению (между сарколеммой и базальной мембраной мышечного волокна), а также при иммуногистохимическом выявлении различных белков, которые экспрессируют эти клетки на разных этапах своего жизненного цикла. Десмин, *myf5*, *MyoD* обнаружены в активированных и пролиферирующих сателлитных клетках; для них характерна экспрессия генов регуляторных мышечных факторов, таких, как Pax-7, c-Met. Синтез миогенина и MRF4 характерен для конечной дифференцировки [38]. c-Met – рецептор для HGF – экспрессируется в скелетной мышце кроме сателлитов также и другими миогенными клетками-предшественниками. В сателлитах как покоящихся, так и активированных и пролиферирующих обычно происходит биосинтез молекул клеточной

адгезии, таких, как М-кадгерин (Mcad), NCAM (CD 56, Leu-19, Neural cell adhesion molecule), находящихся в узком пространстве между сателлитом и мышечным волокном. NCAM экспрессируется в активированных сателлитных клетках (миобластах) и в миотубах при регенерации мышцы, а также в нервно-мышечных синапсах. Недавно были получены данные, указывающие на то, что NCAM является наиболее ранним маркером коммитированных миобластов, т.е. определяет их однозначный переход из стадии пролиферации на этап дифференцировки [39].

Ключевой молекулой в миогенном морфогенезе является Mcad. Применяя сочетанное иммунологическое окрашивание на Mcad, NCAM, ламинин, десмин и клеточные ядра, Trintchev и др. [40] установили, что Mcad присутствует в сателлитах и миобластах в нормальной и регенерирующей мышце. По результатам одновременного окрашивания регенерирующей мышцы на Mcad и BrdU авторами был сделан вывод о том, что Mcad экспрессируется преимущественно в митотически неактивных (покоящихся) сателлитных клетках. После слияния миобластов экспрессия Mcad подавляется. Совместная экспрессия NCAM и Mcad очень часто обнаруживается в мышцах с нарушениями иннервации [40]. Позже было показано [41], что при гипертрофии скелетной мышцы, вызванной перегрузкой, на начальных этапах после воздействия стимула увеличивается число миосателлитов, экспрессирующих Mcad, на более поздних сроках растет число клеток, одновременно с Mcad окрашивающихся и на NCAM. Таким образом, окрашивание на Mcad было выявлено как в покоящихся миосателлитах, так и на стадиях пролиферации и дифференцировки.

КЛЕТКИ-МИОСАТЕЛЛИТЫ В УСЛОВИЯХ ГРАВИТАЦИОННОЙ РАЗГРУЗКИ

При вывешивании в мышцах молодых крыс в течение трех дней происходят необратимые процессы перестройки: сокращение числа сателлитных клеток и уменьшение пролиферативного потенциала (по результатам включения BrdU) как в *m. soleus*, так и в *m. extensor digitorum longus*. При этом у растущих животных может необратимо измениться программа развития мышечных волокон с нарушением способности к увеличению числа мио ядер даже при возобновлении нагрузки [42, 43]. Митотическая активность сателлитных клеток уменьшается уже в течение 24 ч после начала вывешивания и полностью прекращается в течение 3–5 дней, причем наиболее сильное уменьшение наблюдается в *m. soleus*. Спустя 48 ч или более развиваются морфологические признаки атрофии [43]. Есть данные об усилении процессов пролиферации в *m. gastrocnemius* мышей в течение первой недели вывешивания [44]. Количество покоящихся и митотически активных сателлитов в мышечном волокне после вывешивания было снижено на 57 % по сравнению с контрольной группой [29]. В другой работе этих же авторов трехмесячное вывешивание не приводило к уменьшению числа и длины мышечных волокон у молодых животных, однако вызывало снижение количества клеток-сателлитов и мио ядер, не связанное с апоптозом, и уменьшение митотической активности сателлитов [45]. Однако в работе Ferreira и др. [44] показано неожиданное усиление пролиферативных процессов в *m. gastrocnemius* мышей в течение первой недели вывешивания.

ВОЗМОЖНЫЕ ПУТИ АКТИВАЦИИ КЛЕТОК-МИОСАТЕЛЛИТОВ

Считается, что в неработающей скелетной мышце миосателлиты находятся в состоянии покоя. Они активируются для выполнения своей роли в поддержании, гипертрофии или участия в восстановительных процессах при повреждении мышцы. Активация миосателлитов происходит также при силовой тренировке [46, 47].

Показано значительное увеличение общего числа клеток-сателлитов в нескольких моделях компенсаторной гипертрофии на животных и после эксцентрической нагрузки у человека [13, 48], а также при растяжении мышцы [49]. Считается, что физическая активность, например резистивная нагрузка или функциональная перегрузка мышцы (хроническое растяжение, удаление мышц-синергистов, тенотомия), вызывают повреждение мышечной ткани [50], которое стимулирует в ней процессы регенерации. Повреждение мышцы вызывает воспалительный ответ, в поврежденной зоне увеличивается количество нейтрофилов и макрофагов с последующим высвобождением клетками воспалительного инфильтрата или самими поврежденными волокнами ростовых факторов, которые могут регулировать пролиферацию или дифференцировку миосателлитов. Было показано, что цитокины (IL-4, IL-6, IL-15, TNF- α и др.) могут влиять на пролиферацию и дифференцировку клеток-сателлитов *in vitro* или в процессе регенерации после повреждения мышцы [51]. Показана роль фактора роста фибробластов (FGF) в активации миосателлитов [52]. Ключевым регулятором активности миосателлитов при регенерации считается фактор роста гепатоцитов (HGF) [18, 53] (рис. 1). Установлено, что HGF вызывает активацию клеток-сателлитов в культуре и *in vivo* при растяжении

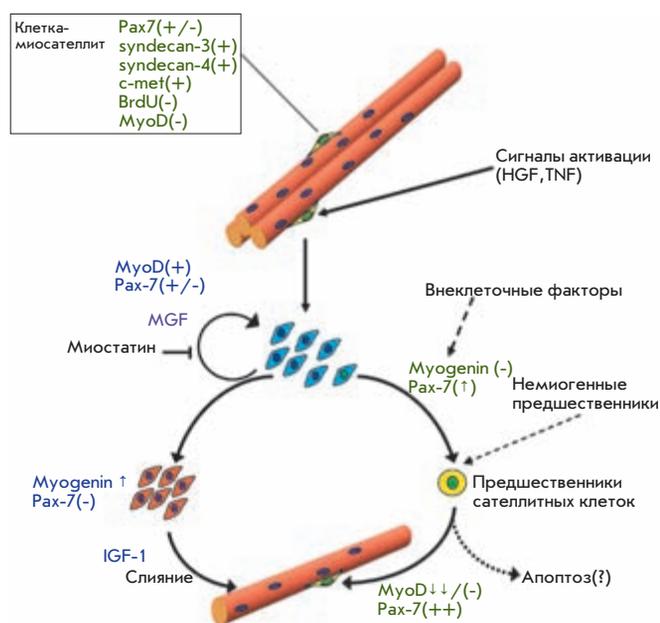


Рис. 1. Гипотетическая роль IGF-1 и MGF в жизненном цикле клеток-миосателлитов. Модифицированная схема Olguin и Olwin [54].

мышцы, причем высвобождение HGF стимулируется синтезом в мышечной ткани оксида азота (NO). Кроме того, показано, что в этом процессе принимают участие матриксные металлопротеиназы (MMPs) [55]. HGF воздействует на миосателлит посредством связывания с его рецептором c-met, запуская дальнейший каскад сигнальных событий, в т.ч. PI3K-Akt-путь, стимулирующий выживание и защиту от апоптоза. Результаты большого количества экспериментов свидетельствуют о важной роли инсулиноподобного фактора роста в развитии мышечной гипертрофии. В экспериментах на животных *in vivo* получены данные, указывающие на роль инсулиноподобного фактора роста (IGF) в ростовых процессах, опосредованных деятельностью миосателлитов [56, 57]. IGF может стимулировать пролиферацию и дифференцировку миосателлитов в культуре [58]. Клетки-миосателлиты мышей с гиперэкспрессией гена IGF-1 обладают повышенным пролиферативным потенциалом, который может вызываться активацией сигнального пути PI3K-Akt и снижением активности ингибитора циклин-зависимой киназы-2 [59], возникающей вследствие ингибирования транскрипционного фактора FOXO [57]. Поэтому сигнальные пути, активируемые IGF-1 в мышечных волокнах и усиливающие трансляцию, предположительно также активируются и в клетках-миосателлитах [60]. Однако IGF-1EA (та форма ростового фактора, которая экспрессируется в клетках печени и в волокнах скелетных мышц и секретируется в системный кровоток) не является единственным продуктом гена IGF-1. В результате физической нагрузки или механического повреждения мышц продукт гена IGF-1 претерпевает сплайсинг, который приводит в течение 1–2 дней к появлению сплайс-варианта, именуемого MGF (механозависимый фактор роста). Во время этого сплайсинга происходит сдвиг рамки считывания, что обуславливает изменение в последовательности домена на С-конце и соответственно появление так называемого E-домена, значительно отличающегося от последовательностей других сплайс-вариантов IGF-1 [61]. Этот уникальный С-концевой пептид работает как аутокринный ростовой фактор, который, как было показано, имеет короткий период полужизни. Одна из функций этого пептида – увеличение пула стволовых клеток скелетной мышцы (клеток-сателлитов) путем инициации пролиферации клеток-предшественников, однако при этом не происходит их дифференцировка по миогенному пути. После начального сплайсинга, приводящего к образованию MGF, продукт гена IGF-1 подвергается дальнейшему сплайсингу с образованием изоформы IGF-1EA. IGF-1EA предположительно стимулирует дифференцировку миосателлитных клеток и их слияние с мышечным волокном [38, 49, 62]. Однако, по мнению Wozniak и др. [38], только для ростового фактора HGF и молекулы NO была доказана их способность активировать миосателлиты, находящиеся в состоянии покоя. IGF, FGF и другие ростовые факторы значительно стимулируют пролиферацию и рост, который следует за активацией сателлитов. Некоторые другие ростовые факторы (в частности, фактор роста фибробластов) также способны активировать пролиферацию сателлитных клеток [52]. Показано, что активация клеток-миосателлитов может подавляться миостатином; предполагается, что именно миостатин поддерживает миосателлиты в состоянии покоя [63].

Однако механизмы, вызывающие активацию и пролиферацию клеток-сателлитов, а также их слияние с поврежденными или растущими мышечными волокнами, в настоящее время остаются до конца не изученными.

РОЛЬ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ В РЕАЛИЗАЦИИ РОСТОВЫХ ПРОЦЕССОВ В МЫШЦЕ

Клетки-сателлиты обладают огромным пролиферативным потенциалом; в настоящее время считается, что их функция важна для гипертрофии и регенерации скелетной мышцы. Различные стимулы, такие, как функциональная перегрузка при удалении мышц-синергистов, тестостерон, кленбутерол, растяжение мышцы и упражнения, могут активировать сателлиты, стимулировать их вступление в клеточный цикл и пролиферацию как в быстрых, так и в медленных мышцах; усиление пролиферации миосателлитов наблюдается уже в первые дни после воздействия стимула. В работах Cramer и др. [46], Kadi и др. [13, 31] после серии интенсивных упражнений существенно увеличивается количество клеток, экспрессирующих NCAM. Однако в этой и других работах не показано, что эти пролиферирующие клетки сливаются с мышечными волокнами. В литературе нет однозначного ответа на вопрос о необходимости инкорпорации ядер миосателлитов в волокно для его роста или поддержания мышечной массы. Среди исследователей существуют различные взгляды на эту проблему. Многие авторы отрицают необходимость инкорпорации ядер миосателлитов в развитии мышечной гипертрофии [64]. Доказательство тому – большое число работ, проведенных с применением β 2-адреномиметиков, вызывающих гипертрофию мышцы без увеличения количества ДНК в ней или увеличения миоядерного числа. Данные Kadi и др. [13] свидетельствуют о том, что умеренные изменения размеров мышечных волокон могут происходить без добавления новых миоядер. Кроме того, было показано, что при нормальных физиологических условиях число миоядер не является определяющим для размера мышечных волокон, размер миоядерного домена варьирует в течение жизни животного [16] и является непостоянным при мышечной атрофии [65]. Несмотря на отсутствие делящихся миосателлитов после воздействия ионизирующей радиацией, в работе Lowe [32] наблюдалась гипертрофия растянутой медленной *m. anterior latissimi dorsi* японских перепелов. В работе Dupont-Versteegden и др. [66] показано, что вслед за активацией миосателлитов (под действием резистивной нагрузки) не следовало их слияние с мышечными волокнами, таким образом, упражнения не способствовали поддержанию миоядерного числа в *m. soleus* спинальных животных. При этом всегда число активированных миосателлитов было выше, чем число разделившихся. Неясной остается физиологическая роль активации такого большого числа миосателлитов, если не происходит инкорпорации их ядер в растущие мышечные волокна. Недавно итальянские авторы показали, что активация протеинкиназы B в течение 3 нед. вызывала гипертрофию мышцы с увеличением массы примерно наполовину и не сопровождалась активацией сателлитов и инкорпорацией новых миоядер [11].

Возможность роста мышцы без инкорпорации сателлитных клеток тем не менее не исключает того, что одним из путей интенсификации синтеза белка является уве-

личение числа матриц ДНК за счет включения в волокно ядер миосателлитов. Сторонники концепции постоянства миоядерного домена считают, что начальные этапы роста мышцы сопряжены с усилением транскрипционных и трансляционных процессов до тех пор, пока миоядерный домен не достигнет определенного предела. И хотя было установлено, что умеренная гипертрофия в мышцах человека может происходить без внесения дополнительного генетического материала [13], с точки зрения вышеупомянутой концепции это объясняется наличием некоторого порогового уровня гипертрофии, чувствительного к инкорпорации новых ядер; т.е. на более поздних стадиях включение ядер миосателлитов является обязательным условием развития гипертрофии мышечных волокон и поддержания размеров ядерного домена [9, 33, 64]. Необходимость миосателлитов для развития мышечной гипертрофии впервые была продемонстрирована в работе Rosenblatt и др. [9]; в их эксперименте предотвращение пролиферации сателлитов γ -облучением снижало гипертрофию при функциональной перегрузке. Было установлено, что гибель сателлитных клеток под действием ионизирующего излучения и предотвращение инкорпорации их ядер в мышечные волокна может полностью нивелировать гипертрофию *m. extensor digitorum longus*, *m. soleus* и *m. plantaris* крыс, вызванную удалением мышц-синергистов или физической нагрузкой [67]. В работе Mitchell и Pavlath [33] после вывешивания и действия ионизирующего облучения, предотвращающего пролиферацию миосателлитов, восстановление мышц проходило нормально лишь на этапе, не требующем включения новых миоядер, после чего процесс восстановления замедлялся. Kawano и др. [45] показали, что у молодых животных при трехмесячном восстановлении после трехмесячного вывешивания площадь поперечного сечения волокон не отличается от показателей контрольных животных на фоне увеличения числа сателлитов и миоядер. Авторы сделали вывод о значимости сателлитных клеток в ростовых процессах, происходящих в камбаловидной мышце [45]. Было показано, что процессы пролиферации, дифференцировки и слияния с мышечными волокнами клеток-миосателлитов в скелетной мышце стимулируются фактором роста IGF-1 [68]. В культуре мышечных волокон IGF вызывал гипертрофию вследствие слияния клеток-миосателлитов [62]. Кроме того, гипертрофия, вызванная IGF-1, сопровождалась увеличением количества ДНК в мышечных волокнах и появлением дополнительных ядер [69]. Также было показано, что облучение наполовину предотвращало гипертрофию *m. extensor digitorum longus*, вызванную введением в нее IGF-1, по-видимому, в той части, которая была обусловлена инкорпорацией ядер миосателлитов в мышечные волокна [70]. Эти результаты указывают на то, что повышенный уровень мышечного IGF-1 при нагрузке может вызывать гипертрофию, в т.ч. за счет стимуляции пролиферации миосателлитов и их слияния с материнским волокном.

Недавно появились данные, свидетельствующие о том, что инкорпорация ядер миосателлитов в волокно может происходить и при низкоинтенсивных хронических нагрузках: при хронической низкочастотной электростимуляции и произвольной активности животных («произвольное колесо») [71]. При таком режиме сократительной активности

обычно не наблюдается рабочая гипертрофия. Однако интенсивно происходит процесс трансформации миозинового фенотипа в медленную сторону. Ранее было показано [72], что увеличение количества медленных волокон при низкочастотной стимуляции быстрых мышц у крыс нельзя полностью объяснить изменением экспрессии миозиновых изоформ внутри волокна. Недавно установлено, что подавление размножения миосателлитов с помощью ионизирующей радиации в значительной степени препятствует трансформации волокон в медленную сторону в условиях низкочастотной хронической стимуляции [73]. Интересно, что фармакологическая стимуляция PPAR β , одного из компонентов сигнальной системы, осуществляющей переключение экспрессии изоформ миозина в медленную сторону внутри миоядер, способствует слиянию миосателлитных клеток с мышечным волокном [74].

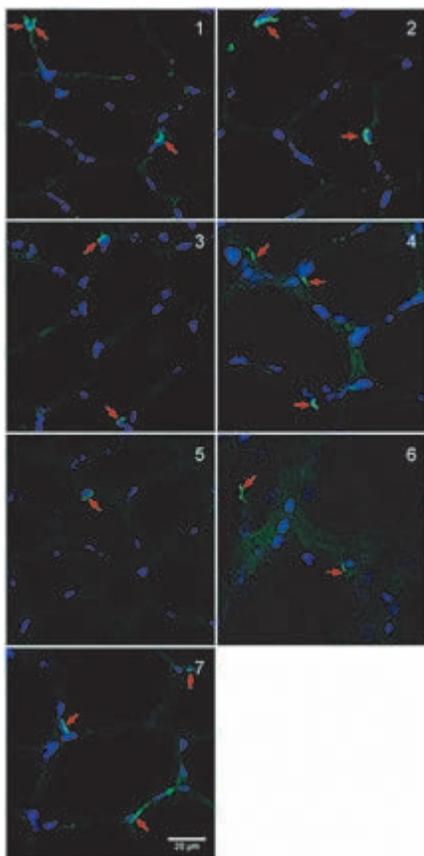
Таким образом, инкорпорация ядер миосателлитных клеток (очевидно, преимущественно с медленным паттерном экспрессии миозиновых изоформ) в мышечное волокно при длительной низкочастотной стимуляции способствует адаптивным изменениям миозинового фенотипа скелетной мышцы.

КЛЕТКИ-МИОСАТЕЛЛИТЫ В СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЕ ПРИ РАСТЯЖЕНИИ И РАСТЯЖЕНИИ НА ФОНЕ РАЗГРУЗКИ

Гравитационная разгрузка – это особый вид редукции сократительной активности мышц. Известно, что резкое снижение (до нуля) электрической активности волокон *m. soleus* наблюдается непосредственно после устранения опоры и продолжается в течение 2–3 сут воздействия. Затем электрическая активность начинает медленно увеличиваться и достигает нормального уровня к 14 сут пребывания в условиях реальной или моделируемой невесомости [75]. Однако постепенно увеличивающаяся активность мышцы не препятствует развитию атрофических процессов. Очевидно, что одновременно с пониженной сократительной активностью действует и другой фактор – резко уменьшенное (в невесомости – до нуля) сопротивление мышечному сокращению (весовая нагрузка), что оказывает значительное влияние на развитие атрофии [76]. Одним из способов исследовать роль этого фактора является хроническое или повторное применение пассивного растяжения, или стретча, на изучаемую мышцу. Стретч компенсирует отсутствие весовой нагрузки и действительно препятствует развитию атрофии [77].

Взаимосвязь между растяжением и активацией клеток-миосателлитов в культуре была показана в экспериментах Tatsumi и др. [78]. Покоящиеся клетки-сателлиты, подвергнутые циклическому растяжению, активировались и вступали в клеточный цикл, что, вероятно, стимулировалось синтезом в растянутых клетках HGF. Из экспериментов этой же группы авторов, применявших у крыс модель кратковременного (в течение 1 ч) растяжения на фоне вывешивания, следует, что в растянутой мышце при механическом растяжении происходит синтез оксида азота (NO). Он вызывает высвобождение связанного с поверхностью мышечных волокон HGF, который связывается с c-Met-рецептором клеток-миосателлитов, что приводит к их активации. В то же время есть данные о том, что при компенсаторной гипертрофии, вызванной удалением мышц-синергистов, включение

Рис. 2. Клетки-миосателлиты на срезах мышечной ткани крыс. Окрашивание на М-кадгерин. Группы: 1 – «вывешивание 3 сут», 2 – «вывешивание + растяжение 3 сут», 3 – «вывешивание 7 сут», 4 – «вывешивание + растяжение 7 сут», 5 – «вывешивание 14 сут», 6 – «вывешивание + растяжение 14 сут», 7 – контроль.



миоядер может протекать независимо от применения блока-тора NOS [79]. В модели Wozniak и др. [38] при растяжении выделенной изолированной мышцы, так же как и при растяжении отдельных мышечных волокон, наблюдается активация клеток-миосателлитов, которую авторы выявляли по усилению инкорпорации BrdU в ядра делящихся клеток. В наших экспериментах при моделируемой гравитационной разгрузке (на модели вывешивания) крыс после 3 дней воздействия не происходит изменение количества экспрессирующих М-кадгерин клеток-миосателлитов в *m. soleus* крыс, но уже после 7 дней разгрузки количество миосателлитов снижается на 30 %, а после 14 дней – вдвое по сравнению с контрольным уровнем. Пассивное растяжение *m. soleus*, примененное одновременно с гравитационной разгрузкой, позволяет поддержать количество сателлитов на 30 % выше контрольного уровня на 3-и и 7-е сут разгрузки и на уровне контроля на 14 сут разгрузки (рис. 2). Мы предположили, что элиминирование пролиферативных возможностей клеток-предшественников γ -облучением приведет к частичной утрате способности мышечных волокон к поддержанию их размеров при растяжении на фоне разгрузки. Эксперимент с локальным облучением голени крыс дозой в 2500 рад и последующим вывешиванием или вывешиванием с растяжением показал, что облучение не оказало никакого воздействия на профилактический эффект пассивного растяжения (предотвращение атрофии, трансформации волокон и снижение числа миоядер), наблюдаемый при вывешивании [80]. Недавно в экспериментах *in vivo* было продемонстрирова-

но, что введение *L*-аргинина (донора NO) при вывешивании снижает степень атрофии мышцы и поддерживает уровень миоядер и миосателлитов на уровне группы контроля. Кроме того, введение ингибитора NO-синтазы *L*-NAME достоверно снижает интенсивность пролиферации миосателлитных клеток в условиях стретча, сочетанного с вывешиванием животного. Таким образом, можно предположить, что в исследованной модели продукция NO оказывает существенное воздействие на пролиферацию миосателлитов. Однако введение ингибитора NO-синтазы не влияло на эффективность поддержания мышечной массы при растяжении (см. выше о значимости пролиферации миосателлитных клеток в условиях гипертрофии) [81].

При растяжении миотуб в культуре высвобождаются и другие эндокринные факторы, в т.ч. IGF. В работах лаборатории Goldspink [49, 61] показано, что активация миосателлитов в *m. tibialis anterior* при растяжении в сочетании с электростимуляцией, а также при механическом повреждении происходит на фоне экспрессии м-РНК IGF-1. Авторы связывают активацию и пролиферацию покоящихся миосателлитов при растяжении мышцы с экспрессией механозависимого фактора роста MGF (пик экспрессии сплайс-варианта MGF наблюдался в первые 4 дня после воздействия), а их дифференцировку и слияние с мышечными волокнами – с более поздней экспрессией IGF-1 EA (с 5-го по 12-й дни после воздействия) [49].

Интересно, что в наших экспериментах интенсификация экспрессии IGF-1 в условиях растяжения, сочетанного с гравитационной разгрузкой, наблюдалась только к 7-м сут воздействия, в то время как (см. выше) количество клеток-миосателлитов увеличивается уже к 3-м сут. Не исключено, что пролиферация этих клеток при стретче в наших условиях может быть связана с более ранней экспрессией MGF. Дальнейшие эксперименты должны прояснить этот вопрос.

Таким образом, можно считать, что усиление пролиферации миосателлитных клеток в условиях растяжения, сочетанного с гравитационной разгрузкой, стимулируемое различными механизмами, не является необходимым условием предотвращения атрофии мышечных волокон. Возможно, что поддержание миоядерного числа в этом случае обусловлено ангиоапоптотическим действием растяжения. Однако сопутствующая этому активация миосателлитов препятствует снижению регенераторного потенциала мышцы.

Итак, в настоящем обзоре мы обсудили одну из наиболее спорных проблем пластичности скелетных мышц – влияние сократительной активности на судьбу миоядерного пула. Важны также перспективы фармакологического и генотерапевтического управления процессами апоптоза миоядер и активности миосателлитных клеток. Требуется изучение применения доноров NO и рекомбинантных аналогов ростовых факторов для противодействия атрофическим изменениям скелетных мышц при постлегипокинетическом восстановлении и реабилитации травмированных спортсменов. ●

Работа поддержана грантами РФФИ 07-04-00763, 08-04-01557, 10-04-00504. Авторы признательны профессору G. Goldspink (Royal Free and University College London) за полезные замечания при обсуждении основных положений обзора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Григорьев А.И., Козловская И.Б., Шенкман Б.С. // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2004. Т. 90 (5). С. 508–521.
2. Григорьев А.И., Шенкман Б.С. // Вестник РАН. 2008. Т. 78 (4). С. 337–345.
3. Shenkman B.S., Nemirovskaya T.L., Shapovalova K.B., et al. // Acta Astronautica. 2007. V. 60. P. 307–313.
4. Allen D.L., Roy R.R., Edgerton V.R. // Muscle Nerve. 1999. V. 22 (10). P. 1350–1360.
5. Cheek D.B. // Early Hum. Dev. 1985. V. 12. P. 211 – 239.
6. Ishido M., Kami K., Masuhara M. // Acta Physiol. Scand. 2004. V. 180 (3). P. 281–289.
7. Allen D.L., Monke S.R., Talmadge R.J., et al. // J. Appl. Physiol. 1995. V. 78 (5). P. 1969–1976.
8. Ohira Y., Yoshinaga T., Ohara M., et al. // J. Appl. Physiol. 1999. V. 87 (5). P. 1776–1785.
9. Rosenblatt J.D., Yong D., Parry D.J. // Muscle Nerve. 1994. V. 17 (6). P. 608–613.
10. Allen D.L., Yasui W., Tanaka T., et al. // J. Appl. Physiol. 1996. V. 81 (1). P. 145–151.
11. Blaauw B., Canato M., Agatea L., et al. // FASEB J. 2009. 23 (11). P. 3896–905.
12. Hikida R., Nostran S., Murray J., et al. // Anat. Rec. 1997. V. 247. P. 350–354.
13. Kadi F., Schjerling P., Andersen L.L., et al. // J. Physiol. 2004. V. 558. P. 1005–1012.
14. Aravamudan B., Mantilla C.B., Zhan W.Z., Sieck G.C. // J. Appl. Physiol. 2006. V. 100 (5). P. 1617–1622.
15. Mantilla C.B., Sill R.V., Aravamudan B., et al. // J. Appl. Physiol. 2008. V. 104 (3). P. 787–794.
16. Schultz E., McCormick K.M. // Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 1994. V. 123. P. 213–257.
17. Day M.K., Allen D.L., Mohajerani L., et al. // J. Gravit. Physiol. 1995. V. 2 (1). P. 47–50.
18. Allen D.L., Linderman J.K., Roy R.R., et al. // Am. J. Physiol. 1997. V. 273. P. 579–587.
19. Ohira M., Hanada H., Kawano F., et al. // Japan. J. Physiol. 2002. V. 52. P. 235–245.
20. Roy R.R., Zhong H., Talmadge R.J., et al. // J. Gravit. Physiol. 2001. V. 8 (2). P. 49–56.
21. Wang X.D., Kawano F., Matsuoka Y., et al. // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 2006. V. 290 (4). P. 981–989.
22. Reimann J., Irintchev A., Wering A. // Neuromuscular Disorders. 2000. V. 10. P. 276–282.
23. Koçtürk S., Kayatekin B.M., Resmi H., et al. // Eur. J. Appl. Physiol. 2008. V. 102 (5). P. 515–524.
24. Smith H.K., Maxwell L., Martyn J.A., Bass J.J. // Cell. Tissue. Res. 2000. V. 302 (2). P. 235–241.
25. Ferreira R., Neuparth M.J., Vitorino R., et al. // Physiol. Res. 2008. V. 57 (4). P. 601–611.
26. Oishi Y., Ogata T., Yamamoto K.I., et al. // Acta Physiol. (Oxf). 2008. V. 192 (3). P. 381–395.
27. Dupont-Versteegden E.E., Strotman B.A., Gurley C.M., et al. // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2006. V. 291 (6). P. 1730–1740.
28. Nagano K., Suzuki E., Nagano Y., et al. // Acta Histochem. 2008. V. 110 (6). P. 505–518.
29. Bruusgaard J.C., Gundersen K. // J. Clin. Invest. 2008. V. 118 (4). P. 1450–1457.
30. Carson J.A., Alway S.E. // Am. J. Physiol. 1996. V. 270 (2 Pt 1). P. 578–584.
31. Kadi F., Thornell L.E. // Histochem. Cell. Biol. 2000. V. 113 (2). P. 99–103.
32. Lowe D.A., Alway S.E. // Cell Tissue Res. 1999. V. 296 (3). P. 531–539.
33. Mitchell P.O., Pavlath G.K. // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 2001. V. 281 (5). P. 1706–1715.
34. Grounds M.D. // Pathol. Res. Pract. 1991. V. 187 (1). P. 1–22.
35. Seale P., Rudnicki M.A. // Dev. Biol. 2000. V. 218 (2). P. 115–224.
36. Asakura A., Seale P., Girgis-Gabardo A., Rudnicki M.A. // J. Cell. Biol. 2002. V. 159 (1). P. 123–134.
37. Parise G., O'Reilly C.E., Rudnicki M.A. // Appl. Physiol. Nutr. Metab. 2006. V. 31 (6). P. 773–781.
38. Wozniak A.C., Kong J., Bock E., et al. // Muscle Nerve. 2005. V. 31 (3). P. 283–300.
39. Capkovic K.L., Stevenson S., Johnson M.C., et al. // Exp. Cell. Res. 2008. V. 314 (7). P. 1553–1565.
40. Irintchev A., Zeschnigk M., Starzinski-Powitz A., Wernig A. // Dev. Dyn. 1994. V. 199 (4). P. 326–337.
41. Ishido M., Uda M., Masuhara M., Kami K. // Acta Physiol. (Oxf). 2006. V. 187 (3). P. 407–418.
42. Mozdziaik P.E., Pulvermacher P.M., Schultz E. // J. Appl. Physiol. 2000. V. 88. P. 158–164.
43. Schultz E., Darr K.C., Macius A. // J. Appl. Physiol. 1994. V. 76. P. 266–270.
44. Ferreira R., Neuparth M.J., Ascensão A., et al. // Eur. J. Appl. Physiol. 2006. V. 97 (3). P. 340–346.
45. Kawano F., Takeno Y., Nakai N., et al. // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 2008. V. 295 (2). P. 458–467.
46. Cramer R.M., Langberg H., Magnusson P., et al. // J. Physiol. 2004. V. 558. P. 333–340.
47. Kadi F., Charifi N., Denis C., et al. // Pflügers Arch. 2005. V. 451 (2). P. 319–327.
48. Adams G.R., Haddad F., Baldwin K.M. // J. Appl. Physiol. 1999. V. 87 (5). P. 1705–1712.
49. Hill M., Wernig A., Goldspink G. // J. Anat. 2003. V. 203 (1). P. 89–99.
50. Allen D.G., Whitehead N.P., Yeung E.W. // J. Physiol. 2005. V. 567 (3). P. 723–735.
51. Husmann I., Soulet L., Gautron J., Martelly I., Barritault D. // Cytokine Growth Factor Rev. 1996. V. 7 (3). P. 249–258.
52. Kästner S., Elias M.C., Rivera A.J., Yablonka-Reuveni Z. // J. Histochem. Cytochem. 2000. V. 48 (8). P. 1079–1096.
53. Anderson J.E. // Mol. Biol. Cell. 2000. V. 11 (5). P. 1859–1874.
54. Olguin H.C., Olwin B.B. // Dev. Biol. 2004. V. 275 (2). P. 375–388.
55. Yamada M., Sankoda Y., Tatsumi R., et al. // Int. J. Biochem. Cell. Biol. 2008. V. 40 (10). P. 2183–2191.
56. Rosenblatt J.D., Parry D.J. // J. Appl. Physiol. 1992. V. 73 (6). P. 2538–2543.
57. Machida S., Booth F.W. // Proc. Nutr. Soc. 2004. V. 63 (2). P. 337–340.
58. Adi S., Bin-Abbas B., Wu N.Y., Rosenthal S.M. // Endocrinology. 2002. V. 143 (2). P. 511–516.
59. Chakravarthy M.V., Abbrah T.W., Schwartz R.J., et al. // J. Biol. Chem. 2000. V. 275 (46). P. 35942–35952.
60. Sartorelli V., Fulco M. // Sci. STKE. 2004. V. 244. P. 11.
61. Goldspink G. // Physiology (Bethesda). 2005. V. 20. P. 232–238.
62. Jacquemin V., Furling D., Bigot A., et al. // Exp. Cell. Res. 2004. V. 299 (1). P. 148–158.
63. McCroskery S., Thomas M., Maxwell L., Sharma M., Kambadur R. // J. Cell. Biol. 2003. V. 162 (6). P. 1135–1147.
64. O'Connor R.S., Pavlath G.K., McCarthy J.J., Esser K.A. // J. Appl. Physiol. 2007. V. 103(3). P. 1107.
65. Wada K.I., Katsuta S., Soya H. // Japan. J. Physiol. 2003. V. 53 (2). P. 145–150.
66. Dupont-Versteegden E.E., Murphy R.J., Houlié J.D., Gurley C.M., Peterson C.A. // Am. J. Physiol. 1999. V. 277. P. 89–97.
67. Li P., Akimoto T., Zhang M., et al. // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2006. V. 290 (6). P. 1461–1468.
68. Florini J.R., Ewton D.Z., Coolican S.A. // Endocr. Rev. 1996. V. 17 (5). P. 481–517.
69. Barton-Davis E.R., Shoturma D.I., Musaro A., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95 (26). P. 15603–15607.
70. Barton-Davis E.R., Shoturma D.I., Sweeney H.L. // Acta Physiol. Scand. 1999. V. 167 (4). P. 301–305.
71. Kurosaka M., Naito H., Ogura Y., et al. // J. Sports Science and Medicine. 2009. V. 8. P. 51–57.
72. Delp M.D., Pette D. // Cell Tissue Res. 1994. V. 277 (2). P. 363–371.
73. Martins K.J., Murdoch G.K., Shu Y., et al. // Pflügers Arch. 2009. V. 458 (2). P. 325–335.
74. Giordano C., Rousseau A.S., Wagner N., et al. // Pflügers Arch. 2009. V. 458 (5). P. 901–913.
75. Ohira Y., Jiang B., Roy R.R., et al. // J. Appl. Physiol. 1992. V. 73. P. 51–57.
76. Falempin M., Mounier Y. // Acta Astronaut. 1998. V. 42 (1–8). P. 489–502.
77. Ohira Y., Yoshinaga T., Yasui W., et al. // J. Appl. Biomechanics. 2000. V. 16. P. 80–87.
78. Tatsumi R., Liu X., Pulido A., et al. // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 2006. V. 290 (6). P. 1487–1494.
79. Gordon S.E., Westerkamp C.M., Savage K.J., et al. // Can. J. Physiol. Pharmacol. 2007. V. 85 (6). P. 646–651.
80. Таракина М.В., Туртикова О.В., Немировская Т.Л. и др. // Цитология. 2008. Т. 50 (2). С. 140–146.
81. Каргашикина Н.Л., Туртикова О.В., Кузнецов С.Л. и др. // Докл. РАН. 2010. В печати.

УДК 577.152.351, 577.151.02

Биоинформатический анализ и молекулярное моделирование участия Lys65 в каталитической триаде D-аминопептидазы из *Ochrobactrum anthropi*

И. Г. Халиуллин^{1,2}, Д. А. Суплатов¹, Д. Н. Шалаева¹, М. Оцука³, Я. Асано³, В. К. Швьядас^{1*}¹Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, МГУ, 1, стр. 73²Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, МГУ, 1, стр. 3³Центр биотехнологических исследований Университета префектуры Тояма, Имизу, Тояма 939-0398, Япония

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

Поступила в редакцию 23.04.2010 г.

РЕФЕРАТ Биоинформатический и филогенетический анализ семейства пенициллин-связывающих белков, включающего D-аминопептидазы, амидазы D-аминокислот, DD-карбоксипептидазы и бета-лактамазы, показывает, что D-аминопептидаза из *Ochrobactrum anthropi* обладает достоверным сходством с другими ферментами и содержит консервативные для всего семейства аминокислотные остатки: S62, K65, Y153, N155, H287, G289. Три из них: каталитический Ser62, Lys65 и Tyr153 – образуют триаду переноса протона, обеспечивающую активацию обобщенного нуклеофила активного центра фермента в процессе катализа. Молекулярное моделирование показало, что консервативный остаток Lys65 имеет необычно низкое значение pKa, которое подтверждено экспериментальным исследованием pH-профиля каталитической активности D-аминопептидазы. Полученные данные позволили установить роль остатка Lys65 в механизме действия D-аминопептидазы как общего основания, ответственного за передачу протона от каталитического остатка Ser62 к остатку Tyr153 и обратно на стадиях образования и расщепления промежуточного ацилфермента.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА D-аминопептидаза, семейство пенициллин-связывающих белков, биоинформатический анализ, механизм действия.

ВВЕДЕНИЕ

D-аминопептидаза из *Ochrobactrum anthropi* является уникальным ферментом по своему строению и свойству катализировать расщепление широкого ряда производных D-аланина с высокой стереоспецифичностью [1]. Фермент представляет собой сериновую гидролазу и действует в виде гомодимера, субъединицы которого организованы в трехдоменную структуру. Каталитический домен фермента имеет т.н. бета-лактамазное строение [2]. Сравнение аминокислотных последовательностей также обнаруживает сходство D-аминопептидазы с такими ферментами, как DD-карбоксипептидаза и бета-лактамаза [3].

Механизм действия D-аминопептидазы в литературе не обсуждался, однако при рассмотрении этого вопроса можно принять во внимание предположения, относящиеся к другим ферментам семейства – амидазе D-аминокислот из *Ochrobactrum anthropi*, а также бета-лактамазам и пенициллин-связывающим белкам. Имеются разные представления о каталитическом механизме функцио-

нирования пенициллин-связывающих белков, в которых различные остатки активного центра, расположенные недалеко от каталитического серина, рассматриваются как потенциальные кандидаты на роль общего основания в ходе ферментативной реакции [4–6]. Выбирая между этими остатками, необходимо, с одной стороны, учитывать pH-профиль каталитической активности и, с другой стороны, принимать во внимание влияние окружения такого остатка на его pK, поскольку общее основание должно действовать в депротонированной форме.

При помощи гибридных методов КМ/ММ в работе [7] было проведено детальное исследование процесса деацилирования в ферментах семейства пенициллин-связывающих белков на примере двух представителей: DD-пептидазы R61 из *Streptomyces* sp. и бета-лактамазы P99 класса C из *Enterobacter cloacae*. Был сделан вывод о главенствующей роли остатка тирозина активного центра на стадии деацилирования каталитического остатка серина этих ферментов.

Обобщая литературные данные, следует сказать, что до сих пор не существует четкого представления о механизме действия D-аминопептидазы. Целью настоящей работы было применение методов биоинформатики и молекулярного моделирования для выяснения роли аминокислотного остатка Lys65 в каталитической триаде D-аминопептидазы из *Ochrobactrum anthropi*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и методы экспериментального исследования

Выделение и очистка фермента проведена по методике, описанной ранее [1]. Хромогенный субстрат – *n*-нитроанилид D-аланина (D-Ala-pNA) – продукт компании Bachem. Компонент буферного раствора трис(гидроксиметил)аминометан (Tris) степени чистоты research grade – компании Serva Electrophoresis.

Кинетические исследования проводили с использованием интегрального метода слежения за накоплением продукта реакции в условиях полного превращения субстрата. Обработку интегральных кривых накопления продукта проводили линеаризацией полученных данных в координатах $t/\ln(p_{\infty}/(p_{\infty}-p)) - p/\ln(p_{\infty}/(p_{\infty}-p))$, где t – время, p – концентрация продукта в данный момент времени, p_{∞} – концентрация продукта после окончания реакции гидролиза. Данная анаморфоза позволяет найти значения отношений K_M/V_{max} и $1/V_{max}$ как наклон прямой и отсекаемый от оси ординат отрезок соответственно. Нелинейную регрессию зависимости V_{max}/K_M от pH и расчет экспериментальных значений pKa проводили в программе SciDAVis [8].

Ферментативную реакцию гидролиза инициировали добавлением небольшого количества раствора фермента к смеси, содержащей субстрат в концентрации, превышающей значение K_M примерно в 4 раза. Реакцию проводили в термостатируемой при 25 °C спектрофотометрической кювете объемом 500 мкл и длиной оптического пути 1 см. Изменения поглощения регистрировали на спектрофотометре Shimadzu UV-1601 в режиме Kinetics при длине волны 450 нм. Конечное значение поглощения во всех экспериментах не превышало 2 оптических единицы.

Для поддержания заданного значения pH в реакционной смеси ферментативную реакцию проводили в 0.1 М буферных растворах Tris-HCl. При приготовлении буферных растворов использовали стеклянный pH-чувствительный электрод Hamilton Slimtrode.

Методы биоинформатического анализа

Поиск по гомологии. Во всех процедурах поиска по гомологии в качестве затравки использовали структуру D-аминопептидазы из *Ochrobactrum anthropi* 1E15 из банка данных PDB или содержащуюся в ней аминокислотную последовательность. Обнаружение сходства по первичной структуре проводили с помощью программы PSI-BLAST [9] v. 2.2.18 по базе данных Non-redundant. Полученные структуры выравнивали с помощью алгоритмов t-coffee [10], mafft [11] и probcons [12], объединенных посредством статистики позиционной устойчивости (Consistency Objective Function), реализованной в программе t-coffee. Последо-

вательности, идентичные более чем на 95 %, группировали в кластеры, из которых для последующего анализа отбирали только одного представителя.

Обнаружение сходства по третичной структуре проводили с помощью программы SSM [13] по всему банку данных белковых структур PDB. Полученные результаты дискриминировали на основании процента совпавших элементов вторичной структуры при наложении на структуру 1E15. Финальную выборку анализировали в рамках трехмерного выравнивания, выполненного программой MUSTANG [14].

Биоинформатический анализ. Филогенетический анализ полученных выравниваний по структурам и по последовательностям проводили с помощью пакета программ PHYLIP [15]. Конструирование филогенетических деревьев проводили методом поиска ближайшего соседа по матрице парных расстояний. Биоинформатический анализ проводили с помощью оригинального программного обеспечения ZEBRA v. 3.2. При этом отбор результатов осуществляли на уровне статистической достоверности 2.2×10^{-43} .

Визуализация. Для просмотра выравниваний по первичным структурам использовали программу Jalview [16]. Для визуализации трехмерного выравнивания использовали программу PyMol [17]. Генерацию изображения филогенетического дерева выполняли с помощью программы PHYLIP [15]. Генерацию логотипов участков первичной структуры осуществляли с помощью интернет-ресурса WebLogo [18].

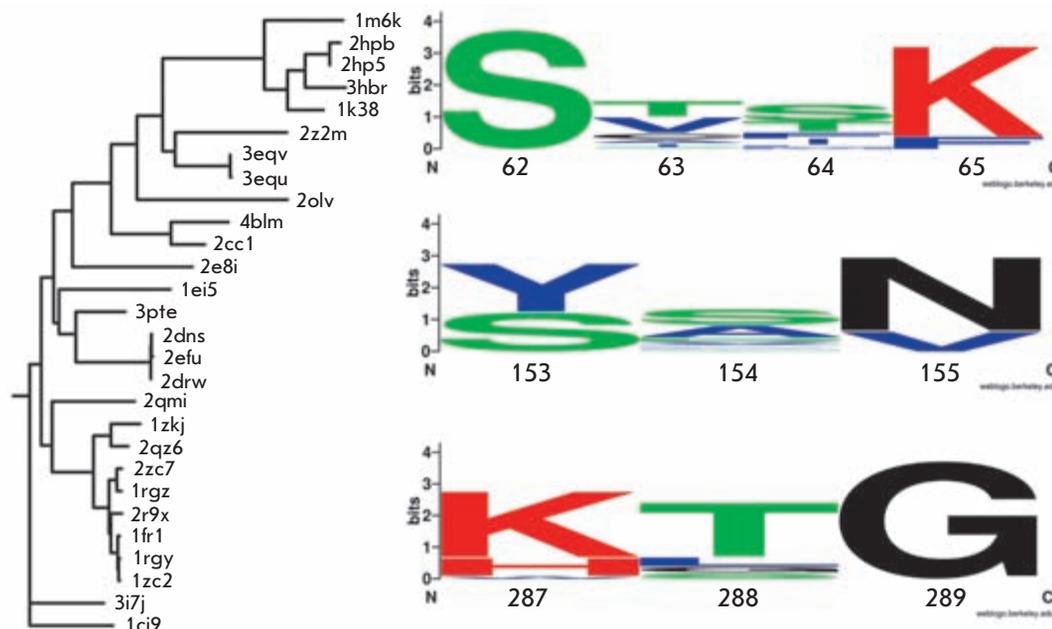
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Биоинформатический анализ семейства белков, гомологичных D-аминопептидазе

Для сбора и анализа данных по семейству пенициллин-связывающих белков, включающего D-аминопептидазы, D-амидазы аминокислот, щелочные D-пептидазы и бета-лактамазы, был проведен поиск гомологов D-аминопептидазы из *Ochrobactrum anthropi* по первичной и третичной структуре в банках данных белковых последовательностей UniProt и белковых структур PDB. Полученная в результате выборка из 734 гомологов по первичной структуре и 24 гомологов по третичной структуре была профильтрована, и наиболее информативные последовательности отобраны для проведения множественного выравнивания по первичной и третичной структуре. Выравнивание трехмерных структур показало, что область активного центра D-аминопептидазы обладает достоверным сходством с D-амидазами аминокислот, щелочными D-пептидазами и бета-лактамазами как на уровне аминокислотной последовательности, так и на уровне пространственной организации (рис. 1).

Определение консервативных позиций в активных центрах пенициллин-связывающих белков было проведено с использованием программного обеспечения ZEBRA, ранее разработанного в нашей лаборатории. Следующие позиции в структуре D-аминопептидазы определены как консервативные: 287H, 153Y, 155N, 289G, 273G,

Рис. 1. Филогенетическое дерево семейства пенициллин-связывающих белков и мотивы первичной структуры, содержащие важные для каталитического механизма аминокислотные остатки Ser62 и Lys65 (SXHK), Tyr153 ([YS] XN) и His287 ([KN] XG). Обозначение представителей семейства пенициллин-связывающих белков на филогенетическом дереве соответствует номерам соответствующих записей в банке данных PDB.



293G, 270Y, 65K, 224G, 62S, 68T, 294W, 64S, 151Y, 228I, 60I, 288G (нумерация по структуре 1EI5, остатки приведены в порядке уменьшения степени консервативности); они локализованы в общем для семейства пенициллин-связывающих белков каталитическом домене, который имеет альфа-бета организацию и определяется как «трех-

слойный сандвич» по структурной классификации CATH [19] (рис. 2). Учитывая тот факт, что степень консервативности аминокислотного остатка в структуре фермента свидетельствует о давлении естественного отбора на эту позицию и говорит о ее структурной или функциональной значимости [20], можно предположить участие обнаруженных аминокислот в механизме действия D-аминопептидазы (рис. 2).

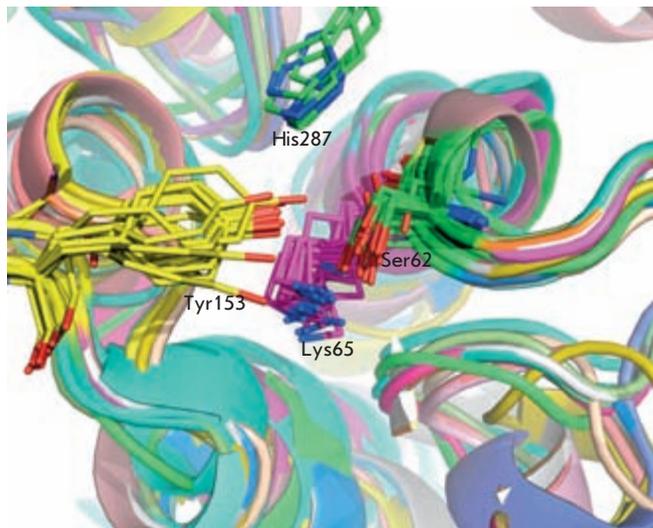


Рис. 2. Фрагмент трехмерного выравнивания представителей семейства пенициллин-связывающих белков – структурных гомологов D-аминопептидазы из *Ochrobactrum anthropi*. Показаны остатки активного центра, участвующие в каталитическом механизме (Ser62, Lys65, Tyr153, His287) и являющиеся консервативными в D-аминопептидазе и других представителях семейства.

Анализ структуры D-аминопептидазы

Анализ структуры D-аминопептидазы (1EI5) выявляет пару близко расположенных остатков Tyr153 и Lys65 в окружении каталитического остатка Ser62 с примерно равным расстоянием от нуклеофильного атома Oγ серина. Три указанных остатка образуют почти равносторонний треугольник в пространстве активного центра (рис. 3). Такое расположение остатков обеспечивает организацию каталитической триады, когда атом водорода гидроксильной группы серина направлен внутрь треугольника и поделен между всеми тремя остатками. Особенность организации каталитической триады обусловлена весьма необычной ролью аминокислотного остатка Lys65, способного акцептировать протон в нейтральной и слабощелочной среде и обеспечивать высокую реакционную способность остатка Ser62 при образовании промежуточного ацилфермента.

Значительно более низкое значение pKa остатка Lys65, равное 7.8, по сравнению с обычными значениями pK остатков лизина в белках 10–11 было обнаружено при расчете ионизационных свойств аминокислотных остатков активного центра D-аминопептидазы QSAR-методом PROPKA [21]. Следует отметить также довольно высокое значение pKa, найденное для остатка Tyr153, равное 11.85.

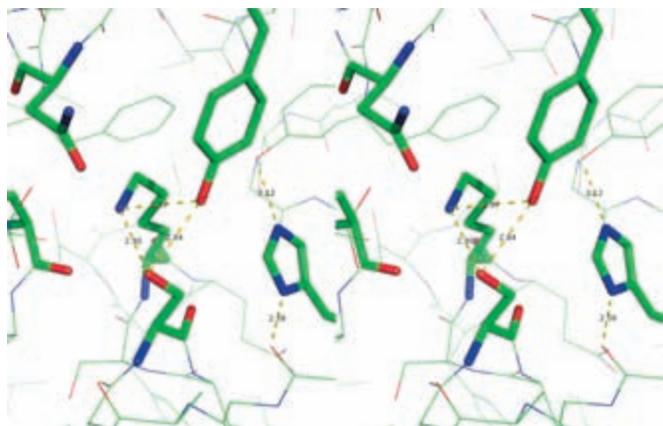


Рис. 3. Стереобразное изображение активного центра D-аминопептидазы, показывающее структурную организацию каталитической триады. Выделены остатки S62, K65, Y153, N155, H287 и D225.

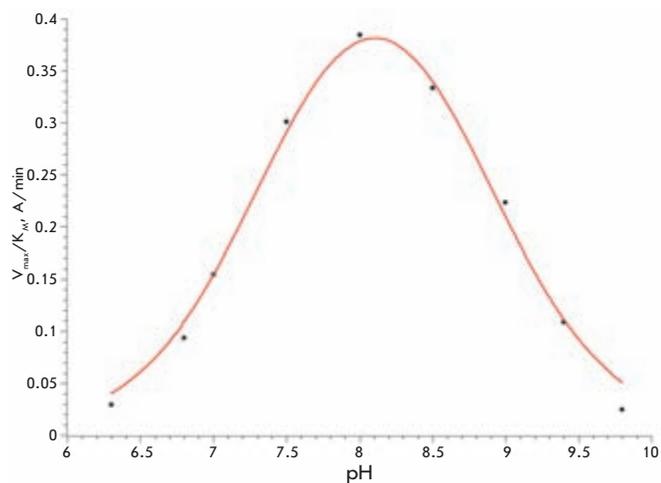


Рис. 4. pH-профиль каталитической активности D-аминопептидазы. Расчетная кривая построена по уравнению $v = v_0 / (1 + [H^+]/K_1 + K_2/[H^+])$ со значениями v_0 , pK_1 и pK_2 , равными 0.53, 7.4 и 8.8 соответственно.

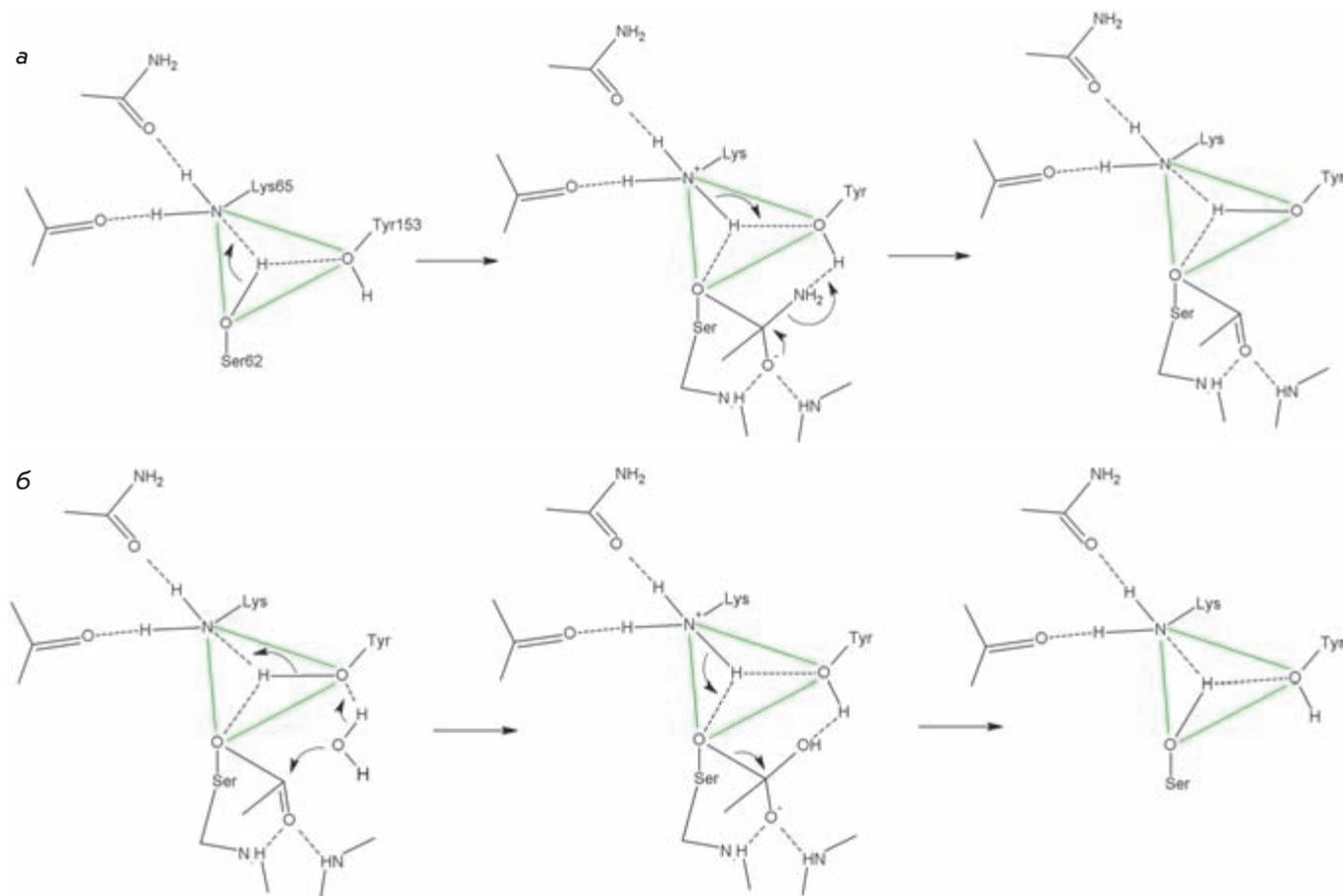


Рис. 5. Схематическое изображение стадий ацилирования (а) и деацилирования (б) остатка Ser62 в механизме действия D-аминопептидазы. Последовательно показано: а – организация каталитической триады и исходное состояние свободного фермента, связывание субстрата и нуклеофильная атака остатком Ser62 молекулы субстрата с образованием первого тетраэдрического интермедиата, отщепление уходящей группы и образование ацилфермента; б – связывание нуклеофила (молекулы воды), активация и нуклеофильная атака с образованием второго тетраэдрического интермедиата, отщепление ацильной части субстрата и регенерация свободного фермента.

Экспериментальное определение рН-профиля активности D-аминопептидазы

Экспериментальные данные хорошо согласуются с результатами молекулярного моделирования и предполагаемой ролью остатка Lys65 в функционировании каталитической триады. Исследование показало, что рН-профиль каталитической активности D-аминопептидазы имеет колоколообразную форму (рис. 4). Аминокислотный остаток фермента с рКа 7.4 на основании результатов молекулярного моделирования был определен как Lys65.

Предполагаемый механизм действия D-аминопептидазы

Как и в случае других сериновых гидролаз, реакция, катализируемая D-аминопептидазой, протекает по трехстадийной схеме через стадии образования промежуточного ковалентного ацилфермента и последующего его гидролиза (или переноса ацильной части на внешний нуклеофил). Низкое значение рКа остатка Lys65 обуславливает следующую роль этого остатка в механизме реакций, катализируемых D-аминопептидазой (рис. 5).

Незаряженный в условиях рН-оптимума ферментативной реакции остаток Lys65 выполняет функцию общего основания при атаке Оγ атома Ser62 по карбонильной группе субстрата и принимает протон с атакующей ОН-группы при образовании тетраэдрического интермедиата на стадии ацилирования.

С разрушением тетраэдрического интермедиата и образованием ацилфермента уходящая группа принимает близко расположенный и образующий с ней водородную связь протон гидроксильной группы остатка Tyr153, значение рКа которого понижено за счет близко расположенного положительного заряда остатка Lys65. Одновременно с этим получившийся нестабилизированный оксианион, будучи более сильным основанием, депротонирует остаток лизина.

Процесс деацилирования каталитического остатка серина фермента протекает посредством активации молекулы воды (или другого внешнего нуклеофила) при совместном действии двух оснований Lys65 и Tyr153 и передаче протона по цепочке от нуклеофила к остатку Tyr153, а от остатка Tyr153 к Lys65 – с образованием второго тетраэдрического интермедиата.

Одновременно с разрушением второго тетраэдрического интермедиата и последующим отрывом ацильной части субстрата (выделением второго продукта реакции) образующийся окси-анион Ser62 депротонирует остаток Lys65, и фермент приходит к первоначальному состоянию.

ВЫВОДЫ

Проведен биоинформатический и филогенетический анализ семейства пенициллин-связывающих белков, включающего D-аминопептидазы, и определены консервативные аминокислотные остатки. Три из них: каталитический Ser62, Lys65 и Tyr153 – образуют необычную триаду переноса протона, обеспечивающую активацию обобщенного нуклеофила активного центра фермента в процессе катализа. При помощи молекулярного моделирования показано, что консервативный остаток Lys65 имеет необычно низкое значение рКа, которое подтверждено также экспериментальным исследованием рН-профиля каталитической активности D-аминопептидазы. Полученные данные позволили установить роль остатка Lys65 в механизме действия D-аминопептидазы как общего основания, ответственного за передачу протона от каталитического остатка Ser62 к остатку Tyr153 и обратно на стадиях образования и расщепления промежуточного ацилфермента. ●

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований и Японским обществом продвижения науки (грант № 09-08-92104-ЯФ).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Asano Y, Nakazawa A., Kato Y, Kondo K. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 14233–14239.
- Bompard-Gilles C., Remaut H., Villeret V., et al. // Structure. 2000. V. 8. P. 971–980.
- Asano Y, Kato Y, Yamada A., Kondo K. // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 2316–2328.
- Okazaki S., Suzuki A., Komeda H., et al. // J. Mol. Biol. 2007. V. 368. P. 79–91.
- Massova I., Kollman P. // J. Comput. Chem. 2002. V. 23. P. 1559–1576.
- Ke Y, Lin T. // Biophys. Chem. 2005. V. 114. P. 103–113.
- Gherman B., Goldberg S., Cornish V., Friesner R. // J. Am. Chem. Soc. 2004. V. 126. P. 7652–7664.
- SciDAVis: a free application for scientific data analysis and visualization. <http://scidavis.sourceforge.net/>
- Altschul S., Madden T., Schäffer A., et al. // Nucleic Acids Res. 1997. V. 25. P. 3389–3402.
- Notredame C., Higgins D., Heringa J. // J. Mol. Biol. 2000. V. 302. P. 205–217.
- Kato K., Asimenos G., Toh H. // Methods Mol. Biol. 2009. V. 537. P. 39–64.
- Do C., Mahabhashyam M., Brudno M., Batzoglou S. // Genome Res. 2005. V. 15. P. 330–340.
- Krissinel E., Henrick K. // Acta Cryst. 2004. V. D60. P. 2256–2268.
- Konagurthu A., Whisstock J., Stuckey P., Lesk A. // Proteins. 2006. V. 64. P. 559–574.
- Felsenstein J. 2005. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle, USA.
- Waterhouse A., Procter J., Martin D., Clamp M., Barton G. // Bioinformatics. 2009. V. 25. P. 1189–1191.
- The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.0r1, Schrödinger, LLC. <http://www.pymol.org/>
- Crooks G., Hon G., Chandonia J., Brenner S. // Genome Research. 2004. V. 14. P. 1188–1190.
- Koonin E., Galperin M. Sequence - Evolution - Function: Computational Approaches in Comparative Genomics. Kluwer Academic Publishers, 2003. P. 461.
- Pearl F., Bennett C., Bray J., et al. // Nucleic Acids Res. 2003. V. 31. P. 452–455.
- Li H., Robertson A., Jensen J. // Proteins. 2005. V. 61. P. 704–721.

УДК 571.27

Разработка рекомбинантной вакцины против гриппа А(Н1N1) 2009 на основе вирусоподобных наночастиц – носителей внеклеточного домена М2 белка

Р. Ю. Котляров¹, В. В. Куприянов¹, А. И. Мигунов², Л. А. Степанова², Л. М. Цыбалова²,
О. И. Киселев², Н. В. Равин^{1*}, К. Г. Скрябин¹

¹ Центр «Биоинженерия» РАН, 117312, Москва, просп. 60-летия Октября, 7, корп. 1

² ГУ НИИ гриппа СЗО РАМН, 197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, 15/17

* E-mail: nravin@biengi.ac.ru

Поступила в редакцию 23.04.2010 г.

РЕФЕРАТ Используемые в настоящее время противогриппозные вакцины основаны на получаемом в куриных эмбрионах вирусе гриппа или его компонентах. Изменчивость высокоиммуногенных поверхностных белков вируса гриппа – гемагглютинина и нейраминидазы – требует создания вакцин, соответствующих новым штаммам вируса. Альтернативой традиционным вакцинам являются рекомбинантные вакцины, основанные на отдельных белках вируса гриппа, которые могут быть получены в стандартных организмах-продуцентах. Мы сконструировали рекомбинантные наноразмерные вирусоподобные частицы на основе ядерного антигена вируса гепатита В, несущие на своей поверхности полипептид внеклеточного домена М2 белка вируса нового высокопатогенного штамма «свиного» гриппа А(Н1N1) 2009. Разработаны методы получения этих вирусоподобных частиц в клетках *Escherichia coli*, их выделения и очистки. В результате испытаний полученных препаратов на животных показано, что М2sНВс частицы являются высокоиммуногенными и обеспечивают защиту иммунизированных мышей от летальной инфекции вирусом «свиного» гриппа.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА грипп, вакцина, М2 белок, наночастица, НВс антиген.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ М2е – внеклеточный домен М2 белка вируса гриппа, НВс – ядерный антиген вируса гепатита В, М2sНВс – гибридный белок, включающий М2е вируса «свиного» гриппа и НВс, ПЦР – полимеразная цепная реакция, ИФА – иммуноферментный анализ, ФСБ – фосфатно-солевой буфер, ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка, ТМБ – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, LD₅₀ – доза, соответствующая 50 %-ной летальности.

ВВЕДЕНИЕ

Грипп является одним из наиболее распространенных вирусных заболеваний человека и животных. Вирусы гриппа типа А различаются по степени патогенности в отношении человека и животных. В последние годы высокопатогенные штаммы H5N1 вызывали локальные вспышки с высокой смертностью в регионах Юго-Восточной Азии. Вирус H1N1 свиного происхождения вызвал пандемию гриппа 2009–2010 гг. с неожиданно высоким уровнем смертности среди людей среднего возраста и групп риска. По многим фенотипическим свойствам и филогенетическому происхождению пандемический вирус H1N1v близок к вирусу, вызвавшему «испанку» в 1918–1920 гг., что подтверждает возможность возврата в циркуляцию среди людей вирусов с высоким потенциалом патогенности. Используемые в настоящее время противогриппозные вакцины основаны на получаемом в куриных эмбрионах вирусе гриппа или его компонентах [1]. Высокая изменчивость поверхностных белков вируса, гемагглютинина и нейраминидазы приводит к возникно-

ванию нового эпидемического штамма каждые 1–2 года [2], с такой же частотой требуется изготовление стандартных штамм-специфических вакцин.

Одним из потенциальных источников антигенной изменчивости вируса гриппа человека является его рекомбинация (реассортация) с вирусами гриппа животных, которая может привести к возникновению нового высокопатогенного рекомбинантного вируса, неизвестного иммунной системе человека и потому способного вызвать пандемию. В то же время создание традиционной вакцины от нового штамма требует длительного времени (от 6 до 9 мес.), в течение которого появление нового пандемического штамма гриппа может привести к гибели миллионов людей. Как уже указывалось, таким новым высокопатогенным штаммом является вызвавший пандемию 2009 г. вирус так называемого «свиного» гриппа, относящийся, по последовательностям его гемагглютинина и нейраминидазы, к типу H1N1.

Альтернативой традиционным вакцинам являются рекомбинантные вакцины, основанные на отдельных бел-

Таблица 1. Сравнение аминокислотных последовательностей внеклеточных доменов M2 белков различных штаммов вируса гриппа человека и животных. Отличия от консенсусной последовательности M2e «человеческого» вируса гриппа типа А подчеркнуты

Хозяин	Штамм	Последовательность M2e пептида
Свинья/ человек	A/California/04/2009	SLLTEVETPTRSEWECRCSDSSD
Человек	Консенсусная последовательность	SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD
>>	A/PR/8/34	SLLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD
Птица	A/Chicken/Kurgan/05/2005	SLLTEVETPTRNEWECRCSDSSD
>>	A/Duck/ Potsdam1402-6/1986	SLLTEVETPTRNGWECKCSDSSD

ках вируса гриппа, которые могут быть получены в стандартных организмах-продуцентах, например бактериях или дрожжах. Использование рекомбинантных вакцин не только снимает зависимость производства от куриных эмбрионов и решает проблемы безопасности, общие для вакцин, основанных на цельном патогене [3], но и открывает возможности создания универсальных вакцин при использовании консервативных белков вируса. Более того, такой подход позволяет, с одной стороны, подготовить вакцину очень быстро или создавать вакцины, которые перекрывают антигенные свойства большинства пандемических вирусов.

В работах группы W. Fiers (University of Ghent) исследовалась возможность создания универсальной противогриппозной вакцины на основе внеклеточного домена M2 белка вируса гриппа [4, 5]. M2 является небольшим трансмембранным белком (97 а.о.), он в небольших количествах представлен в составе вириона, но эффективно экспрессируется в инфицированных клетках [6, 7]. Важной особенностью M2 является его консервативность, последовательность его внеклеточного домена M2e (23 а.о.) практически неизменна у всех вирусов гриппа типа А, выделенных у человека начиная с 1933 г. [4, 8, 9]. Однако M2 обладает низкой иммуногенностью, и при инфекции иммунный ответ против него практически не активируется [10].

Решением проблемы низкой иммуногенности M2 белка является присоединение его к наноразмерной частице-носителю. Такая нановакцина, имитируя патоген, обладает высокой иммуногенностью и эффективно распознается иммунной системой человека. В работах группы W. Fiers в качестве носителя M2e пептида использовали вирусоподобные частицы, образуемые НВс антигеном вируса гепатита В [4, 11]. Иммунизация мышей рекомбинантными M2eНВс частицами, полученными в *E. coli*, обеспечивала 100 %-ную защиту от летальной гриппозной инфекции [4]. Помимо НВс в качестве частиц-носителей M2e могут быть использованы вирусоподобные частицы на основе папилломавируса человека [12], бактериофага Qβ [13], вируса мозаики папайи [14] и вируса мозаики коровьего гороха [15].

Как отмечалось выше, последовательность M2e высококонсервативна у всех штаммов вируса гриппа типа А человека, однако у штаммов животного происхождения она существенно отличается [16, 17]. Так, M2e вируса «свиного» гриппа А/California/04/2009(H1N1), вызвавшего панде-

мию 2009 г., по 4 из 23 аминокислотных остатков отличается от консенсусной последовательности M2e штаммов человека (табл. 1). Такие различия могут определять специфичность вакцин на основе M2e. В этой работе мы сконструировали рекомбинантные частицы (M2sНВс-частицы), представляющие на своей поверхности M2e пептид вируса «свиного» гриппа А/California/04/2009(H1N1), и показали, что иммунизация этими наночастицами обеспечивает 100 %-ную защиту иммунизированных мышей от летальной инфекции вирусом «свиного» гриппа А/California/04/2009(H1N1). В то же время защита от заражения птичьим штаммом А/Duck/Potsdam1402-6/1986 или «человеческим» штаммом А/PR/8/34 оказалась лишь частичной, что свидетельствует о необходимости учета различий последовательностей M2e штаммов гриппа различного происхождения при разработке универсальных противогриппозных вакцин.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Конструирование экспрессионного вектора pQE-M2sНВс и создание штамма-продуцента *E. coli*

Ген, кодирующий гибридный белок M2sНВс, синтезировали с помощью трехстадийной ПЦР. На первом этапе часть последовательности M2sНВс была получена в результате ПЦР с использованием праймеров M2F3 (С GAA TGG GAA TGC CGT TGC AGC GAT AGC AGC GAT GAC CCT) и НВс-R2 (А GGA TCC TCA GCA AAC AAC AGT AGT CTC CGG AAG) и ДНК копии генома вируса гепатита В в качестве матрицы. На втором этапе полученный фрагмент использовали в качестве матрицы для ПЦР с праймерами M2sF1 (GAA ACC CCG ACC CGT AGC GAA TGG GAA TGC CGT TGC AGC) и НВс-R2. На третьем этапе полноразмерный ген M2sНВс получали в результате ПЦР-амплификации с праймерами M2sF2 (СТС АТГ АГС СТГ СТГ АСС GAA GTG GAA ACC CCG ACC CGT АГС) и НВс-R2. Полученный фрагмент длиной 525 нт обрабатывали рестриктазами PаgI и VаmНI, сайты узнавания которых были введены в последовательности праймеров M2sF2 и НВс-R2 соответственно, и клонировали в экспрессионном векторе pQE60 (Qiagen) по сайтам NcoI и VаmНI. Полученный экспрессионный вектор pQE-M2sНВс использовали в дальнейшей работе. Отсутствие обусловленных ПЦР мутаций в синтезированном гене было подтверждено с помощью секвенирования.

Таблица 2. Схема опыта по изучению иммуногенности и протективного действия кандидатной вакцины на основе M2e пептида вируса «свиного» гриппа

Группа мышей	Кол-во мышей	1-я иммунизация	2-я иммунизация	3-я иммунизация	Заражение вирусом гриппа		
					A/Duck/Potsdam/1402-6/1986 (H5N2)	A/California/04/2009 (H1N1)	A/PR/8/34
Опытная (M2sHBc)	60	60 мышей с адъювантом TiterMax Gold Adjuvant 50 мкг/мышь п/к*	60 мышей с неполным адъювантом Фрейнда 50 мкг/мышь п/к	60 мышей с неполным адъювантом Фрейнда 50 мкг/мышь п/к	20 мышей дозой 5 LD ₅₀	20 мышей дозой 5 LD ₅₀	10 мышей дозой 5 LD ₅₀
Контрольная (нативные мыши)	40	Физ. раствор	Физ. раствор	Физ. раствор	15 мышей дозой 5 LD ₅₀	15 мышей дозой 5 LD ₅₀	10 мышей дозой 5 LD ₅₀

* п/к – подкожное введение.

Для получения штамма-продуцента рекомбинантного белка M2sHBc плазмиду pQE-M2sHBc вводили в клетки *E. coli* штамма DLT1270 с помощью трансформации. Штамм DLT1270, являющийся производным штамма DH10B [18], содержит ген репрессора лактозного оперона *lacI*, интегрированный в хромосому.

Выделение и очистка M2sHBc частиц

Штамм DLT1270/pQE-M2sHBc выращивали в LB-бульоне до середины логарифмической фазы роста (OD₆₀₀ = 0.5) при 37 °С, добавляли IPTG до 1 мМ и продолжали культивировать в течение 16 ч при 30 °С. Клетки штамма-продуцента после индукции осаждали центрифугированием 3000 об/мин в течение 30 мин и ресуспендировали в 50 мМ Tris-HCl-буфере pH 8.0, содержащем 0.5 М NaCl, 15 мМ ЭДТА и 20 % сахарозы из расчета 1 мл буфера на 50 мл культуральной жидкости. Клеточную суспензию обрабатывали лизоцимом (1 мг/мл) в течение 15 мин при 4 °С, затем клетки разрушали ультразвуком. К полученному лизату добавляли 1/20 объема раствора полиэтиленгликоля (50 % вес/объем) и инкубировали 30 мин при 4 °С. Затем проводили центрифугирование в течение 10 мин при 13 000 об/мин. К супернатанту добавляли 1/5 объема насыщенного раствора сульфата аммония, перемешивали и оставляли на 30 мин при 4 °С. Образовавшийся после центрифугирования осадок белков растворяли в 1 мл того же буфера и повторно осаждали сульфатом аммония в тех же условиях. Полученный осадок растворяли в 1 мл 50 мМ Tris-HCl-буфера с pH 8.0, содержащего 0.5 М NaCl, 15 мМ ЭДТА и 20 % сахарозы. Полученный препарат M2sHBc частиц содержал, по данным SDS-PAGE, около 90 % белка M2sHBc в концентрации ~ 0.5 мг/мл.

Иммунизация мышей

Для изучения иммуногенности и протективного действия кандидатной вакцины была использована схема иммунизации с применением для первого введения вакцины адъюванта TiterMax Gold Adjuvant (Sigma) и последующих иммунизаций — неполного адъюванта Фрейнда (Sigma) в соответствии с их инструкцией по применению. Вторая иммунизация была проведена через три недели после первой, третья — через неделю после второй. Схема иммунизации приведена в табл. 2.

Сыворотки собирали через 2 недели после 3-й иммунизации, титры антител определяли в пуле сывороток мышей каждой группы (3–5 мышей). В качестве отрицательного контроля использовали сыворотку неиммунизированных мышей, а как положительный контроль — моноклональные антитела к M2e пептиду штамма A/Duck/Potsdam/1402-6/1986 (H5N2), которые были предоставлены П.Г. Свешниковым (ОАО «ВНЦМДЛ»).

Синтетические пептиды

В качестве стандартов для определения антител против M2e были использованы синтетические пептиды G-11-1 (SLLTEVETPTRNEWECRCS DSSD, соответствует M2e штамма A/Chicken/Kurgan/05/2005), G-19 (SLLTEVETPTRNGWECKCSDSSD, соответствует M2e штамма A/Duck/Potsdam1402-6/1986), G-26 (SLLTEVETPTRSEWECRCS DSSD, соответствует M2e штамма A/California/04/2009) и G18 (SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD, соответствует M2e штамма A/PR/8/34).

ИФА для определения титра специфических антител

Для проведения ИФА 96-луночные планшеты с высокой сорбционной способностью (Greiner, Германия) покрывали синтетическими пептидами G-11-1, G19, G26 и G18 в концентрации 5 мкг/мл (в карбонатном буфере, pH 9.5–9.6), выдерживали ночь при 4 °С. Планшеты обрабатывали блокирующим буфером (0.01 М ФСБ pH 7.–7.4) с 5 %-ной ЭТС в течение 1 ч при комнатной температуре, отмывали 3 раза ФСБ с твином. Пул сывороток мышей каждой группы исследовали в дубликатах. В лунки планшета добавляли 100 мкл 2-кратных разведений сывороток (начиная с 1:400) в блокирующем буфере, инкубировали 1 ч при комнатной температуре. В качестве конъюгата использовали кроличьи поликлональные антимышьиные IgG (Abscam, Великобритания) в разведении 1:8000, меченные пероксидазой хрена. В качестве субстрата использовали ТМБ. Учет реакции проводили при длине волны 450 нм. За титр принимали наибольшее разведение сыворотки, при котором оптическое поглощение по крайней мере в 2 раза больше, чем оптическое поглощение сыворотки неиммунизированных мышей в том же разведении.

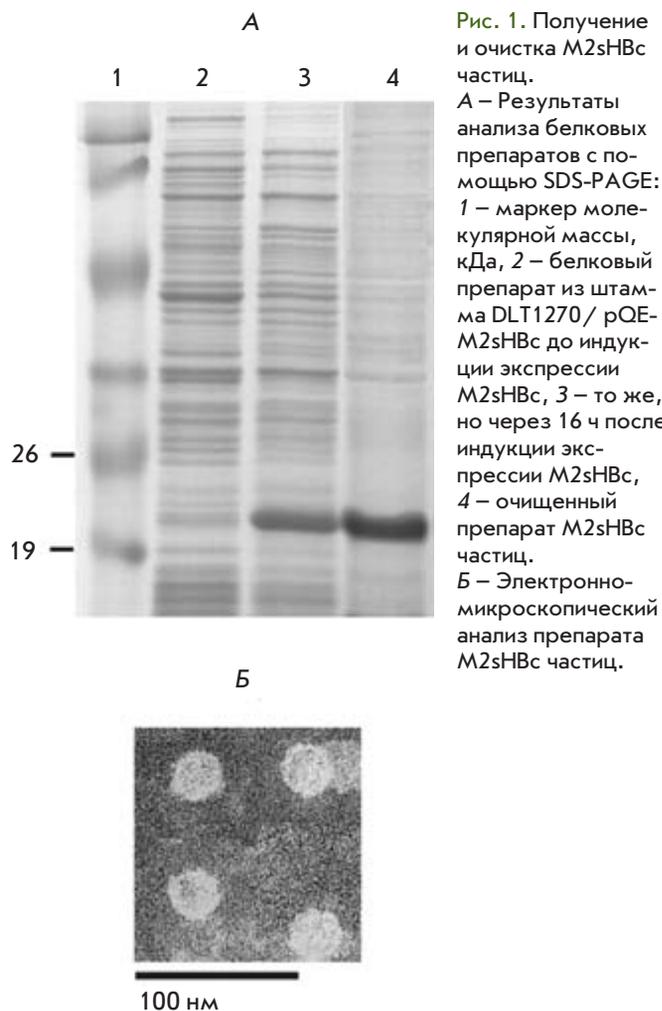


Рис. 1. Получение и очистка M2sHBc частиц. **А** – Результаты анализа белковых препаратов с помощью SDS-PAGE: 1 – маркер молекулярной массы, кДа, 2 – белковый препарат из штамма DLT1270/ pQE-M2sHBc до индукции экспрессии M2sHBc, 3 – то же, но через 16 ч после индукции экспрессии M2sHBc, 4 – очищенный препарат M2sHBc частиц. **Б** – Электронно-микроскопический анализ препарата M2sHBc частиц.

Вирусы и заражение мышей

Для заражения животных, иммунизированных кандидатными вакцинами, были использованы следующие вирусы гриппа, адаптированные к мышам: A/Duck/Potsdam/1402-6/1986 (H5N2), A/California/04/2009 (H1N1) и A/PR/8/34 (H1N1). Вирусы вводили интраназально в дозе 5 LD₅₀ по 50 мкл/мышь под легким эфирным наркозом. После заражения ежедневно наблюдали за животными. Протективное действие кандидатной вакцины оценивали с помощью двух параметров: определения динамики падения массы тела и выживаемости мышей после заражения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Дизайн и получение M2sHBc наночастиц

Ядерный антиген вируса гепатита В является одним из наиболее эффективных носителей антигенных детерминант. Мономеры этого белка, состоящие из 183 а.о., собираются в икосаэдрические частицы диаметром 34 нм, состоящие из 240 субъединиц, организованных в димерные блоки [19]. Два района HBc антигена могут быть использованы

для презентации чужеродных пептидов на поверхности HBc частиц – N-конец белка и иммунодоминантная петля, расположенная между 75-м и 85-м аминокислотными остатками белка [20 – 22]. Согласно нашему опыту, введение чужеродных последовательностей в иммунодоминантную петлю в большинстве случаев нарушает сборку и/или растворимость частиц, поэтому для конструирования гибридного белка M2sHBc в качестве места вставки M2e пептида был использован N-конец HBc. Последовательность HBc содержит аргинин-богатый С-концевой домен, связывающий вирусную ДНК при сборке вириона, при экспрессии в *E. coli* этот домен связывает бактериальную РНК [23], наличие которой в препарате нежелательно. Поскольку С-концевой домен (150–183 а.о.) не требуется для сборки частиц [24], он был удален и заменен остатком цистеина, введение которого повышает стабильность HBc частиц [16]. Таким образом, сконструированный нами гибридный белок M2sHBc включал, начиная с N-конца, последовательность M2e вируса «свиного» гриппа A/California/04/2009 (H1N1), последовательность HBc антигена от 4-й до 149-й аминокислоты и С-концевой цистеин.

Ген, кодирующий гибридный белок M2sHBc, был синтезирован с помощью трехстадийной ПЦР с использованием последовательности HBc в качестве матрицы. На каждой стадии к 5'-концу синтетического гена добавлялись последовательности, кодирующие участки M2e. Полученный синтетический ген клонировали в экспрессионном векторе pQE60 (Qiagen) под контролем промотора, индуцируемого IPTG. Гибридный белок хорошо экспрессируется в *E. coli* (рис. 1А) и в основном содержится в растворимой фракции. Сборка M2sHBc в вирусоподобные наночастицы была подтверждена электронно-микроскопическим анализом очищенного препарата (рис. 1Б).

Иммуногенность M2sHBc частиц

Для характеристики иммуногенности и протективного действия был проведен эксперимент по иммунизации мышей очищенным препаратом M2sHBc частиц. Опытную группу из 60 животных иммунизировали подкожно с применением для первого введения вакцины адьюванта TiterMax Gold Adjuvant (Sigma), а для двух последующих иммунизаций – неполного адьюванта Фрейнда (Sigma). Для определения иммуногенности кандидатной вакцины были исследованы сыворотки мышей через 2 недели после 1-й и после 3-й иммунизации, титры антител определяли в пуле сывороток мышей каждой группы (3–5 мышей). Для проведения ИФА использовали четыре синтетических пептида, последовательности которых соответствовали M2e вируса «свиного» гриппа A/California/04/2009, двум штаммам птичьего гриппа и штамму A/PR/8/34 человека. Полученные результаты (табл. 3) показывают, что после 3-кратной иммунизации в высоких титрах образуются сывороточные антитела изотипа IgG, связывающиеся как с синтетическим пептидом G-26 «свиного» гриппа A/California/7/2009, последовательность которого соответствовала использованному для иммунизации M2sHBc, так и с синтетическими пептидами, последовательности которых соответствуют M2e гетерологичных штаммов «птичьего» и «человеческого» гриппа.

Таблица 3. Титры IgG антител к синтетическим пептидам M2e

Образцы сыворотки	Титры антител к синтетическим пептидам M2e			
	G-26	G-19	G-11-1	G-18
Мыши после 1-й иммунизации	1600	1600	800	800
Мыши после 3-й иммунизации	51 200	51 200	51 200	6400
Положительный контроль (моноклональные антитела к пептиду G19 – клон D2)	>51 200	>51 200	>51 200	1600
Отрицательный контроль (сыворотка неиммунизированных мышей)	<400	<400	<400	<400

Протективное действие кандидатной вакцины

Для оценки протективного действия вакцины мышьями опытной и контрольной групп заражали тремя штаммами вируса гриппа, адаптированными к мышам: A/Duck/Potsdam/1402-6/1986 (H5N2), A/California/04/2009 (H1N1) и A/PR/8/34 (H1N1). Вирусы вводили интраназально в дозе 5 LD₅₀.

На рис. 2 показана динамика падения массы тела животных после заражения 5 LD₅₀ вируса «свиного» гриппа A/California/4/2009, что может являться показателем тяжести протекания заболевания. После инфицирования масса иммунизированных животных снижалась (до 90 % от начальной), но в значительно меньшей степени, чем у мышьями контрольной группы (до 70 % от начального веса). Эти результаты показывают, что иммунизация кандидатной вакциной не предотвращает гриппозную инфекцию, но облегчает ее протекание.

Динамика гибели мышьями после заражения различными штаммами вируса гриппа представлена на рис. 3. Полученные данные свидетельствуют о 100 %-ном протективном действии M2sHBc после трехкратной иммунизации. За весь период наблюдения все животные в этой группе остались

живы. В контрольной группе мышьями при этих условиях заражения выжило лишь 12 % животных. Частичная защита от инфекции наблюдалась и в отношении штаммов гриппа, у которых аминокислотная последовательность M2e пептида отличается от таковой в использованном для иммунизации препарате. Так, при инфицировании мышьями вирусом «птичьего» штамма A/Duck/Potsdam/1402-6/1986 наблюдали 60 %-ную выживаемость иммунизированных животных против 13 % в контрольной группе (статистическая значимость P < 0.006, тест Фишера). При инфицировании «человеческим» гриппом A/PR/8/34 выживаемость животных составила 40 % в опытной группе и 20 % – в контрольной.

Перспективы создания универсальных противогриппозных вакцин на основе M2e

Консервативность аминокислотной последовательности M2 белка стала основой разработки противогриппозных вакцин универсального действия на его основе. Поскольку практически все выделенные из человеческой популяции вирусы гриппа типа А имеют одинаковую последовательность M2e, перспектива создания такой вакцины является реальной [5]. Однако появившиеся в последние годы штаммы животного происхождения, в частности вирус «свиного» гриппа, имеют отличия в последовательности M2e пептида, и, как показывают полученные нами результаты, эффективность M2e вакцин в отношении гетерологичных штаммов гриппа является более низкой. Одним из путей создания M2e вакцин, эффективных в отношении широкого спектра штаммов гриппа, как человека, так и животных, может стать включение в состав M2sHBc частиц нескольких копий M2e пептида, последовательности которых соответствуют различным типам M2e.

ВЫВОДЫ

Целью данной работы являлась разработка рекомбинантной кандидатной вакцины против нового высокопатогенного штамма вируса гриппа типа А, «свиного» гриппа H1N1. Использованный нами подход предполагал конструирование нановакцины, в которой внеклеточный домен M2 белка вируса был представлен на поверхности вирусоподобных частиц, образованных ядерным антигеном вируса гепатита В. Полученные нами данные показывают, что гибридный белок M2sHBc эффективно экспрессируется в E. coli и собирается в наноразмерные вирусоподобные частицы. Иммунизация мышьями препаратом M2sHBc частиц вызывает

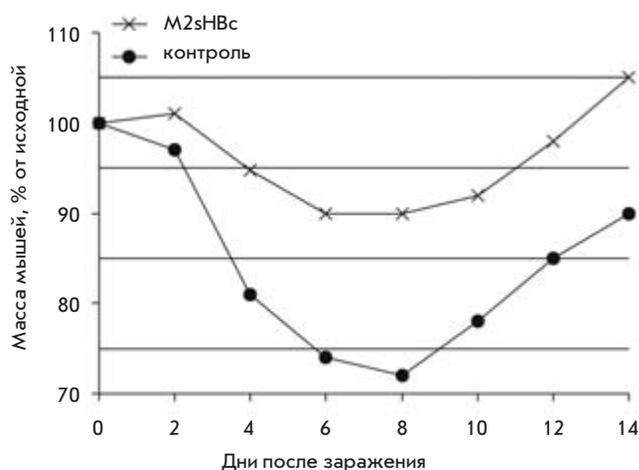


Рис. 2. Динамика изменения массы мышьями после заражения вирусом гриппа A/California/04/2009. Данные в контроле приведены для выживших мышьями.

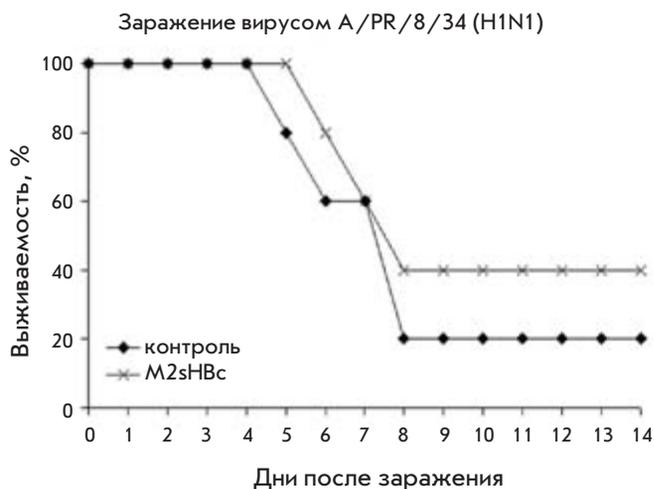
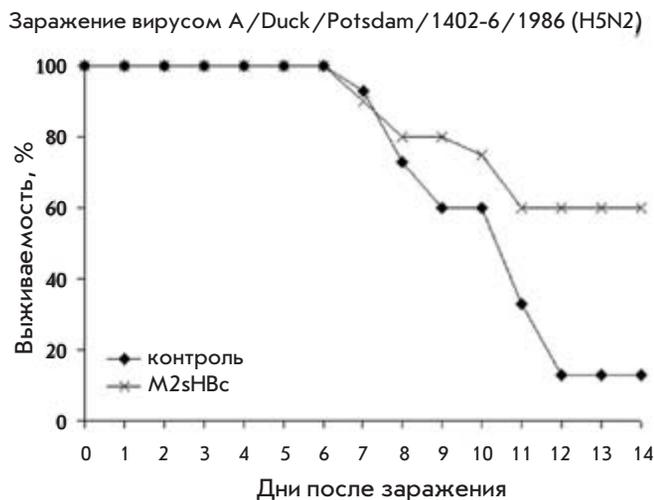
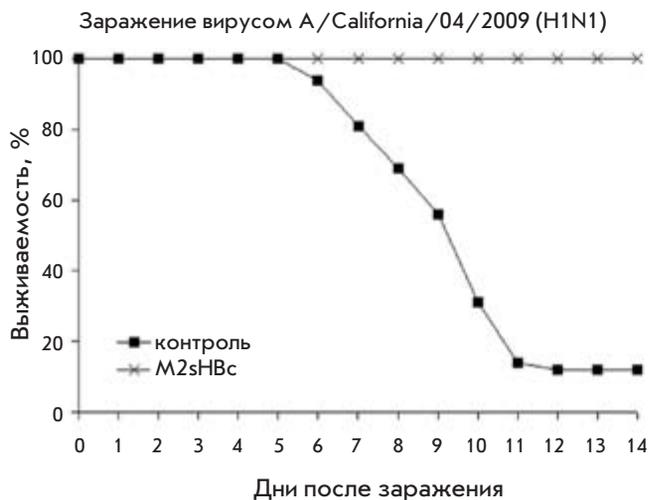


Рис. 3. Динамика гибели мышей, иммунизированных M2sHBc частицами, после заражения различными штаммами вируса гриппа.

эффективный иммунный ответ против M2e и обеспечивает формирование протективного иммунитета в отношении штамма вируса гриппа, имеющего идентичную последовательность M2e пептида. Таким образом, полученные

M2sHBc частицы могут являться основой создания рекомбинантной вакцины против современного пандемического «свиного» гриппа H1N1 и других вирусов, циркуляция которых ожидается в ближайшие годы. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Nicholson K., Webster R., Hay A. Textbook of Influenza. Oxford: Blackwell Science, 1998.
- Webster R., Bean W., Gorman O., Chambers T., Kawaoka Y. // Microbiol. Rev. 1992. V. 56(1). P. 152–179.
- Webby R., Perez D., Coleman J., et al. // Lancet. 2004. V. 363. P. 1099–1103.
- Neiryck S., Deroo T., Saelens X., et al. // Nat. Med. 1999. V. 5. P. 1157–1163.
- Schotsaert M., De Filette M., Fiers W., Saelens X. // Expert Rev Vaccines. 2009. V. 8(4). P. 499–508.
- Lamb R., Zebedee S., Richardson C. // Cell. 1985. V. 40. P. 627–633.
- Pinto H., Holsinger J., Lamb A. // Cell. 1992. V. 69. P. 517–528.
- Fiers W., De Filette M., Birkett A., Neiryck S., Min Jou W. // Virus Res. 2004. V. 103. P. 173–176.
- Ito T., Gorman O., Kawaoka Y., Bean W., Webster R. // J. Virol. 1991. V. 65. P. 5491–5498.
- Feng J., Zhang M., Mozdzanowska K., et al. // Virol. J. 2006. V. 3. P. 102.
- De Filette M., Min Jou W., Birkett A., et al. // Virology. 2005. V. 337 (1). P. 149–161.
- Ionescu R., Przysiecki C., Liang X., et al. // J. Pharm. Sci. 2006. V. 95 (1). P. 70–79.
- Bessa J., Schmitz N., Hinton H., et al. // Eur. J. Immunol. 2008. V. 38 (1). P. 114–126.
- Denis J., Acosta-Ramirez E., Zhao Y., et al. // Vaccine. 2008. V. 26 (2728) P. 3395–3403.
- Мещерякова Ю.А., Эльдаров М.А., Мигунов А.И. и др. // Мол. биол. 2009. Т. 43. С. 741–750.
- De Filette M., Fiers W., Martens W., et al. // Vaccine. 2006. V. 24 (4446) P. 6597–6601.
- Tompkins S., Zhao Z., Lo C., et al. // Emerg. Infect. Dis. 2007. V. 13 (3). P. 426–435.
- Grant S., Jessee J., Bloom F., Hanahan D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. P. 4645–4649.
- Wynne S., Crowther R., Leslie A. // Mol. Cell. 1999. V. 3. P. 771–780.
- Kratz P., Bottcher B., Nassal M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. P. 1915–1920.
- Murray K., Shiau A.L. // Biol. Chem. 1999. V. 380. P. 277–283.
- Pumpens P., Grens E. // Intervirology. 2001. V. 44. P. 98–114.
- Wingfield P., Stahl S., Williams R., Steven A. // Biochemistry. 1995. V. 34. P. 4919–4932.
- Zheng J., Schodel F., Peterson D. // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. P. 9422–9429.

УДК 577.3

Влияние «существенной» легкой цепи А1 миозина на агрегационные свойства миозиновой головки

Д. И. Марков¹, О. П. Николаева², Д. И. Левицкий^{1,2*}¹ Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН² НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

*E-mail: levitsky@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 24.05.2010 г.

РЕФЕРАТ Мы провели сравнительный анализ тепловой агрегации двух изоформ изолированной головки миозина (субфрагмент 1 миозина, S1), содержащих разные «существенные» (или «щелочные») легкие цепи А1 и А2. Температурные зависимости агрегации этих изоформ S1, измеряемые по приросту кажущейся оптической плотности, сопоставляли с температурными зависимостями их тепловой денатурации, полученными методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). При относительно высоких значениях ионной силы (в присутствии 100 мМ КСl), близких к ее физиологическим значениям в мышечном волокне, мы не наблюдали никаких заметных различий между изоформами S1 в характере их тепловой агрегации. Показано, что в этих условиях тепловая агрегация обеих изоформ S1 не зависит от концентрации белка и является следствием его необратимой денатурации, приводящей к слипанию денатурированных молекул S1. Существенные различия между этими изоформами S1 были обнаружены лишь при относительно низких значениях ионной силы раствора. В этих условиях тепловая агрегация изоформы S1, содержащей легкую цепь А1 (но не А2), очень сильно зависела от концентрации белка, при повышении которой от 0.125 до 2 мг/мл кривая агрегации смещалась на ~ 10 градусов в сторону низкой температуры. Сделан вывод, что в условиях низкой ионной силы наиболее важным фактором, определяющим в значительной степени агрегационные свойства этой изоформы S1, являются межмолекулярные взаимодействия, осуществляемые дополнительным (отсутствующим у А2) N-концевым сегментом легкой цепи А1, причем такие взаимодействия не связаны с тепловой денатурацией белка и могут иметь место даже при низкой температуре.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА субфрагмент 1 миозина, «существенные» легкие цепи, агрегация, тепловая денатурация, дифференциальная сканирующая калориметрия.

ВВЕДЕНИЕ

Циклическое взаимодействие головок молекул миозина с актиновыми филаментами, сопровождаемое гидролизом АТФ в головках, лежит в основе молекулярного механизма множества самых разных проявлений биологической подвижности – от процессов внутриклеточного транспорта до мышечного сокращения. К настоящему времени установлено, что именно миозиновая головка является тем молекулярным мотором, который даже в изолированном состоянии способен самостоятельно осуществлять двигательные функции в актомиозиновых системах биологической подвижности [1]. Изолированная головка миозина, называемая субфрагментом 1 миозина (S1), состоит из двух главных структурных доменов – моторного (или каталитического) и регуляторного. Моторный домен представляет собой глобулярную часть головки, содержащую активный центр АТФ-азы и участки связывания актина, а регуляторный домен – это длинная α -спираль, стабилизируемая двумя нековалентно ассоциированными с ней легкими цепями – «существенной» и регуляторной [2]. Согласно современным представлениям функционирование головки

миозина в качестве молекулярного мотора обеспечивается поворотом регуляторного домена относительно моторного домена. При этом регуляторный домен действует как рычаг, усиливающий конформационные изменения, происходящие в моторном домене в процессе АТФ-азной реакции, и его длина определяет величину перемещения миозиновой головки вдоль актинового филамента [3, 4].

Ассоциированные с регуляторным доменом миозиновой головки «существенные» легкие цепи существуют в виде двух изоформ – «длинной» и «короткой». В сердечных мышцах присутствует лишь длинная легкая цепь, в гладких мышцах – только короткая, а в быстрых скелетных мышцах одновременно присутствуют обе изоформы «существенной» легкой цепи, получившие в свое время название «щелочных» легких цепей А1 и А2 для длинной и короткой изоформ соответственно. Эти легкие цепи почти идентичны – за исключением имеющейся у А1 дополнительной N-концевой последовательности из 41 остатка, содержащей многочисленные повторы Ala-Pro и несколько остатков лизина поблизости от N-конца [5]. Функциональная значимость этой N-концевой последовательности остается

пока неясной и интенсивно изучается. К примеру, недавно было показано, что мутации в этой области ассоциированы с развитием тяжелого наследственного заболевания – гипертрофической кардиомиопатии [6].

Препарат S1, получаемый путем расщепления скелетно-мышечного миозина химотрипсином, утрачивает регуляторную легкую цепь, но полностью сохраняет «существенную» легкую цепь [7]. Поскольку миозин скелетных мышц содержит щелочные легкие цепи обоих типов – как A1, так и A2, то такой препарат S1 представляет собой смесь двух изоформ, содержащих либо только A1, либо только A2 (S1(A1) и S1(A2) соответственно). Эти две изоформы S1 можно разделить с помощью ионообменной хроматографии [7], и они широко используются как для сравнительного анализа функций легких цепей A1 и A2, так и для выяснения роли дополнительного N-концевого сегмента последовательности в A1. Так, например, было показано, что при низкой ионной силе сродство S1(A1) к актину значительно выше, чем у S1(A2) [8, 9], причем было установлено, что это происходит благодаря непосредственному взаимодействию дополнительного N-концевого сегмента легкой цепи A1 с актином [10–13]. Следует, однако, отметить, что такое взаимодействие наблюдалось при очень низких значениях ионной силы, далеких от ее физиологических значений, но оно резко снижалось при повышении ионной силы до 120 мМ [9].

Еще одно интересное свойство N-концевого сегмента легкой цепи A1 – это его способность взаимодействовать с глобулярным моторным доменом миозиновой головки. Возможность такого взаимодействия была предсказана одним из нас более 15 лет назад [14]; впоследствии это предположение полностью подтвердилось в работах других авторов [15–17]. Так, в одной из последних работ было продемонстрировано связывание N-концевого сегмента легкой цепи A1 с областью SH3-домена, локализованной поблизости от N-конца тяжелой цепи (остатки 35–80) в моторной части головки [17]. Авторы высказали интересное предположение, что такое связывание может играть достаточно важную роль в процессе взаимодействия миозина с актином, способствуя распрямлению N-концевого сегмента A1 и его превращению в вытянутую антенноподобную структуру, способную достигать поверхности актинового филамента.

В ранних работах было выявлено еще одно интересное различие между двумя изоформами S1 с разными легкими цепями. Было показано, что при нагревании в условиях низкой ионной силы S1(A1) агрегировал при значительно более низкой температуре, чем S1(A2) [18, 19]. Это позволяет предположить, что дополнительный N-концевой сегмент A1, благодаря своей полужесткой вытянутой структуре [20], может вовлекаться не только во внутримолекулярные взаимодействия, но и в межмолекулярные взаимодействия с моторными доменами других молекул S1. Важно отметить, однако, что все ранние исследования агрегации изоформ S1 проводились лишь в условиях очень низкой ионной силы и при высокой концентрации белка [18, 19]. К сожалению, более подробно процесс тепловой агрегации изоформ S1 и роль N-концевого сегмента легкой цепи A1 в этом процессе с тех пор никем не исследовались. Возникает резонный вопрос: могут ли межмолекулярные (или внутримолекулярные) взаимодействия N-концевого сегмента

A1 с моторным доменом S1 оказывать влияние на характер тепловой агрегации S1 в условиях ионной силы, более близких к ее физиологическим значениям? Вопрос этот далеко не праздный, если учесть, что смешанный (не разделенный на изоформы) препарат S1 подвергается интенсивной агрегации при температуре теплового шока (43 °C) в условиях ионной силы, близких к ее физиологическим значениям в мышечном волокне (100 мМ KCl) [21]. Для ответа на этот вопрос в настоящей работе мы провели сравнительный анализ температурных зависимостей агрегации изоформ S1(A1) и S1(A2) при разных значениях ионной силы и разных концентрациях белка, сопоставляя их с температурными зависимостями тепловой денатурации этих изоформ S1, полученными методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

S1 получали, переваривая миозин из скелетных мышц кролика α -химотрипсином [7], и разделяли на изоформы S1(A1) и S1(A2) методом ионообменной хроматографии на колонке с SP-трисакрилом [22]. Концентрацию изоформ S1 измеряли спектрофотометрически, используя коэффициент экстинкции $A^{1\%}$ при 280 нм, равный 7.5 см⁻¹. Спектры поглощения изоформ S1 записывали на спектрофотометре Cary-100 (Varian Inc.).

Температурные зависимости агрегации изоформ S1 регистрировали по приросту кажущейся оптической плотности при 350 нм. Измерения проводили на спектрофотометре Cary-100 (Varian Inc.), снабженном температурной приставкой Biomelt. Образцы S1 прогревали с постоянной скоростью 1 °C/мин от 25 до 65 °C. Измерения проводили в буфере 20 мМ HEPES-KOH (pH 7.3), содержащем 1 мМ MgCl₂, в отсутствие или в присутствии 100 мМ KCl.

Эксперименты по изучению тепловой денатурации изоформ S1(A1) и S1(A2) проводили методом ДСК на дифференциальном сканирующем микрокалориметре ДАСМ-4М (Институт биологического приборостроения РАН, Пушкино) как описано ранее [21, 23, 24]. Образцы, содержащие изоформы S1 (1.5 мг/мл), прогревали с постоянной скоростью 1 °C/мин от 15 до 75 °C. Все измерения проводили в буфере 20 мМ HEPES-KOH (pH 7.3), содержащем 1 мМ MgCl₂, в отсутствие или в присутствии 100 мМ KCl. Для проверки обратимости тепловой денатурации сразу после первого сканирования и охлаждения проводили повторный прогрев образцов. Тепловая денатурация обеих изоформ S1 была полностью необратима.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Прежде всего мы воспроизвели результаты многолетней давности [19], сравнив температурные зависимости агрегации двух изоформ S1 при высокой концентрации белка (1 мг/мл) и низкой ионной силе (в отсутствие KCl). Как видно на рис. 1, в этих условиях наблюдается значительная разница между изоформами S1 в характере их тепловой агрегации: S1(A1) агрегирует при значительно более низкой температуре, чем S1(A2). Эта разница между изоформами S1 заметно уменьшается при снижении концентрации белка: в этих условиях S1(A1) и S1(A2) мало отличаются друг от друга по температуре их тепловой агрегации (рис. 1). При этом температура полумаксимального прироста опти-

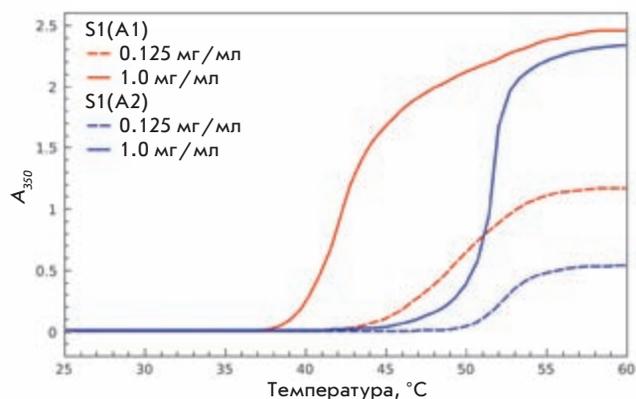


Рис. 1. Температурные зависимости тепловой агрегации S1(A1) и S1(A2), регистрируемой по приросту кажущейся оптической плотности при 350 нм при высокой (1 мг/мл) и низкой (0.125 мг/мл) концентрации белка. Условия: 20 мМ Hepes, pH 7.3, 1 мМ MgCl₂.

ческой плотности у S1(A2) почти не изменяется и составляет 52–53 °С, тогда как в случае S1(A1) этот параметр повышается от 42.5 до 50 °С при снижении концентрации белка от 1 до 0.125 мг/мл (рис. 1). Таким образом, при низкой ионной силе снижение концентрации белка оказывает сильное влияние на характер тепловой агрегации S1(A1), смещая кривую агрегации в сторону более высокой температуры, но не оказывает заметного влияния на тепловую агрегацию S1(A2).

В последующих экспериментах мы сопоставляли нормализованные кривые температурных зависимостей агрегации S1(A1) и S1(A2), полученные при разных концентрациях белка в отсутствие или в присутствии 100 мМ KCl, с кривыми ДСК, отражающими тепловую денатурацию изоформ S1 в тех же условиях. Важно отметить, что все эти эксперименты проводили при одной и той же скорости нагрева (1 °С/мин) и в одних и тех же условиях среды. Исключение составляла лишь концентрация белка, которая не варьировала в калориметрических экспериментах и составляла во всех случаях 1.5 мг/мл. Ранее было показано, однако, что изменения концентрации белка от 0.5 до 2.0 мг/мл не оказывают заметного влияния на температуру максимума кривой теплопоглощения S1 [19]. Таким образом, сопоставление температурных зависимостей тепловой денатурации и агрегации изоформ S1 представляется вполне оправданным.

Для обеих изоформ S1 добавление KCl до концентрации 100 мМ не оказывало заметного влияния на характер их тепловой денатурации: в обоих случаях оно лишь смещало максимум кривой теплопоглощения (T_m) на 1.1 °С в сторону более низкой температуры: с 48 до 46.9 °С в случае S1(A1) и с 48.1 до 47 °С в случае S1(A2) (рис. 2А и 2А'). Напротив, повышение ионной силы раствора резко изменяло характер тепловой агрегации S1(A1), но не S1(A2). При низкой ионной силе мы наблюдали четкую зависимость тепловой агрегации S1(A1) от концентрации белка, при повышении которой от 0.125 до 2 мг/мл кривая агрегации смещалась на ~ 10 °С в сторону низкой температуры: от ~ 50 °С до ~ 40 °С (рис. 2Б). Ничего подобного не наблюдалось в присутствии 100 мМ KCl. В этом случае тепловая агрегация

S1(A1) практически не зависела от концентрации белка: при повышении концентрации S1(A1) от 0.125 до 1.0 мг/мл температура полумаксимального прироста оптической плотности оставалась постоянной и составляла 52 ± 0.5 °С (рис. 2Б). Что касается S1(A2), то тепловая агрегация этой изоформы S1 не зависела ни от концентрации белка, ни от ионной силы (рис. 2Б', Б'), почти не отличаясь от агрегации S1(A1) при высокой ионной силе (рис. 2Б).

Сопоставляя кривые температурных зависимостей агрегации изоформ S1 с кривыми ДСК, отражающими их тепловую денатурацию, можно сделать следующие выводы. Агрегация S1(A2) является следствием тепловой денатурации этой изоформы S1, скорее всего – ее более термостабильного моторного домена [14, 19], денатурация которого лимитирует весь процесс агрегации. Это в полной мере относится и к тепловой агрегации S1(A1) при высокой ионной силе (рис. 2Б). Ничего подобного нельзя, однако, сказать о тепловой агрегации S1(A1) при низкой ионной силе (рис. 2Б). В этом случае отсутствуют какие-либо корреляции между тепловой денатурацией и агрегацией S1(A1). Мы полагаем, что при низкой ионной силе агрегация S1(A1) не является прямым следствием тепловой денатурации белка, будучи по крайней мере отчасти обусловленной взаимодействиями дополнительного N-концевого сегмента легкой цепи A1 с другими молекулами S1. Представляется совершенно очевидным, что вероятность таких межмолекулярных взаимодействий должна существенно возрастать как при повышении концентрации белка, так и при повышении температуры. Этим и объясняется столь необычный характер агрегации S1(A1) в условиях низкой ионной силы (рис. 2Б). Межмолекулярные взаимодействия N-концевого сегмента A1 в значительной степени подавляются, по-видимому, при повышении ионной силы. Этим можно объяснить тот факт, что в присутствии 100 мМ KCl тепловая агрегация S1(A1) (рис. 2Б) мало отличается от агрегации S1(A2) (рис. 2Б').

При внимательном анализе кривых агрегации S1(A1), полученных в условиях низкой ионной силы (рис. 2Б), легко заметить, что при относительно высоких концентрациях белка агрегация начинается при довольно низких температурах (ниже 38 °С). Это позволяет предположить, что при низкой ионной силе агрегация S1(A1), обусловленная межмолекулярными взаимодействиями N-концевого сегмента легкой цепи A1, может медленно происходить и при низкой температуре. Действительно, мы неоднократно наблюдали появление заметной опалесценции в препаратах S1(A1) при их хранении в условиях низкой ионной силы, которая исчезала при добавлении 100 мМ KCl. Отметим, что в экспериментах по тепловой агрегации такие опалесцирующие препараты S1(A1) предварительно подвергались ультрацентрифугированию. Эти наблюдения документально подтверждаются результатами специально проведенного эксперимента, представленными на рис. 3. Видно, что после хранения в условиях низкой ионной силы в течение ночи при 4 °С препарат S1(A1) демонстрирует высокий уровень светорассеяния в области 320–360 нм, где отсутствует поглощение белка (кривая 1 на рис. 3), причем такое светорассеяние полностью исчезает после добавления 100 мМ KCl (кривая 2 на рис. 3). Путем экстраполяции длинноволнового отрезка спектра поглощения S1(A1) в ко-

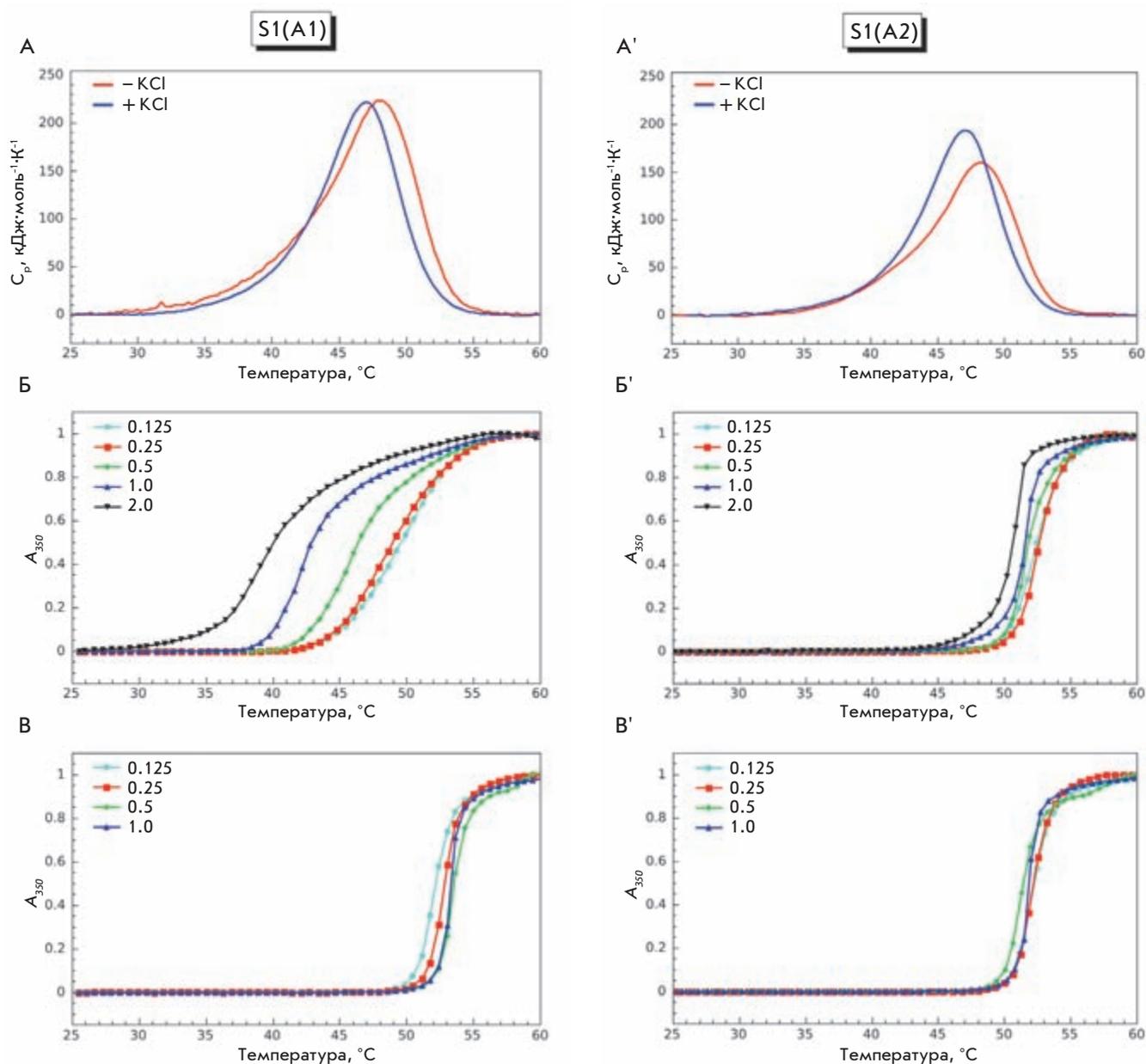


Рис. 2. Тепловая денатурация и агрегация изоформ S1(A1) (A – B) и S1(A2) (A' – B'). A, A' – кривые ДСК, полученные в отсутствие и в присутствии 100 мМ KCl. B, B', B, B' – нормализованные кривые температурных зависимостей тепловой агрегации изоформ S1, полученные при разных концентрациях белка (мг/мл), указанных в обозначениях для каждой кривой, в отсутствие KCl (B, B') или в присутствии 100 мМ KCl (B, B'). Все эксперименты проводили со скоростью нагрева 1 °С/мин. Прочие условия: 20 мМ Neres, pH 7.3, 1 мМ MgCl₂.

ротковолновую область мы рассчитали величину светорассеяния образца по всему волновому диапазону (255–360 нм) и вычли полученную кривую (кривая 3 на рис. 3) из спектра поглощения S1(A1) при низкой ионной силе (кривая 1). Полученная кривая 4, представляющая собой чистый спектр поглощения S1(A1) без вклада светорассеяния, ничем не отличалась от спектра поглощения S1(A1), полученного в присутствии 100 мМ KCl.

Результаты этого эксперимента наглядно свидетельствуют о том, что агрегация S1(A1), обусловленная межмолекулярными взаимодействиями N-концевого сегмента

легкой цепи A1 в условиях низкой ионной силы, происходит даже при хранении препарата S1(A1) в холодильнике. Такая агрегация является обратимой, поскольку образующиеся агрегаты легко разрушаются при повышении ионной силы раствора; в этом отношении она коренным образом отличается от необратимой агрегации, вызываемой тепловой денатурацией белка, которая сопровождается слипанием денатурированных молекул.

Итак, на основании результатов проведенных экспериментов мы полагаем, что различия в характере тепловой агрегации между двумя изоформами S1 обусловлены взаи-

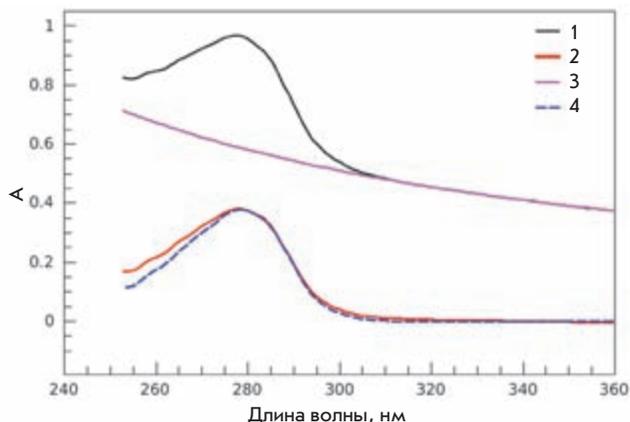


Рис. 3. Спектры поглощения препарата S1(A1) (1 мг/мл), хранившегося при 4 °С в условиях низкой ионной силы (20 мМ Нерес, рН 7.3, 1 мМ MgCl₂), полученные до (1) и после (2) добавления KCl до конечной концентрации 100 мМ. Кривая 3, полученная путем экстраполяции длинноволнового отрезка спектра в коротковолновую область, отражает светорассеяние образца S1(A1) при низкой ионной силе во всем волновом диапазоне, а кривая 4 представляет собой результат вычитания кривой 3 из кривой 1.

модействиями дополнительного N-концевого сегмента легкой цепи A1, отсутствующего у A2, с другими молекулами S1. Такие взаимодействия имеют место только при низкой ионной силе, но подавляются при повышении ионной силы; они проявляются даже при низкой температуре, но их вероятность увеличивается с повышением температуры. Судя по всему, такие межмолекулярные взаимодействия отражают способность N-концевого сегмента легкой цепи A1 к внутримолекулярному взаимодействию с моторным доменом собственной молекулы S1. Такому взаимодействию отводится довольно важная роль в молекулярном механизме мышечного сокращения [16, 17]. Следует отметить, однако, что эксперименты по внутримолекулярному взаимодействию легкой цепи A1 также проводились при довольно низких значениях ионной силы (~ 25 мМ) [17], весьма далеких от ее физиологических значений в мышечном волокне. Тем не менее можно предположить, что вероятность такого внутримолекулярного взаимодействия должна заметно повышаться в процессе АТФ-азной реакции S1 благодаря сближению N-концевого сегмента A1

с моторным доменом S1 вследствие поворота регуляторного домена относительно моторного домена. Это в свою очередь должно снижать вероятность межмолекулярных взаимодействий N-концевого сегмента A1, что должно заметным образом отражаться на агрегационных свойствах S1(A1) при моделировании различных стадий АТФ-азной реакции. Экспериментальная проверка таких предположений составляет одну из целей дальнейших исследований в этом направлении.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований нам удалось установить, что при относительно высоких значениях ионной силы, близких к ее физиологическим значениям в мышечном волокне, наличие дополнительного N-концевого сегмента в существенной легкой цепи A1 не оказывает заметного влияния на агрегационные свойства изолированной головки миозина (S1). В этих условиях тепловая агрегация S1 является следствием необратимой денатурации белка и обусловлена слипанием денатурированных молекул S1. Существенное влияние N-концевого сегмента легкой цепи A1 на агрегацию S1 наблюдается лишь при относительно низких значениях ионной силы раствора. В этих условиях важным фактором, определяющим в значительной степени агрегационные свойства S1, являются межмолекулярные взаимодействия, осуществляемые N-концевым сегментом легкой цепи A1 даже при низкой температуре. Такие межмолекулярные взаимодействия этого сегмента A1 отражают его способность и к внутримолекулярным взаимодействиям, которым приписывается немалая роль в молекулярном механизме мышечного сокращения. Не исключено, что в определенных условиях (например, в процессе АТФ-азной реакции, когда в миозиновой головке происходят значительные конформационные изменения) такие внутримолекулярные взаимодействия N-концевого сегмента легкой цепи A1 могут иметь место в мышечных волокнах даже при относительно высоких значениях ионной силы. ●

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант 09-04-00266), Программой «Молекулярная и клеточная биология» Президиума РАН и грантом Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук (грант МК-2965.2009.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Levitsky D.I. // Biochemistry (Moscow). 2004. V. 69. № 11. P. 1177–1189.
- Rayment I., Rypniewski W.P., Schmidt-Base K., et al. // Science. 1993. V. 261. P. 50–58.
- Rayment I. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 15850–15853.
- Uyeda T.Q., Abramson P.D., Spudich J.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 4459–4464.
- Frank G., Weeds A.G. // Eur. J. Biochem. 1974. V. 44. P. 317–334.
- Hernandez O.M., Jones M., Guzman G., Szczesna-Cordary D. // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2007. V. 292. P. H1643–H1654.
- Weeds A.G., Taylor R.S. // Nature. 1975. V. 257. P. 54–56.
- Wagner P.D., Slayter C.S., Pope B., Weeds A.G. // Eur. J. Biochem. 1979. V. 99. P. 385–394.
- Chalovich J.M., Stein L.A., Greene L.E., Eisenberg E. // Biochemistry. 1984. V. 23. P. 4885–4889.
- Sutoh K. // Biochemistry. 1982. V. 21. P. 3654–3661.
- Trayer I.P., Trayer H.R., Levine B.A. // Eur. J. Biochem. 1987. V. 164. P. 259–266.
- Hayashibara T., Miyanishi T. // Biochemistry. 1994. V. 33. P. 12821–12827.
- Andreev O.A., Saraswat L.D., Lowey S., et al. // Biochemistry. 1999. V. 38. P. 2480–2485.
- Levitsky D.I. Domain Structure of the Myosin Head // Soviet Scientific Reviews. Section D – Physico-chemical Biology. Harwood Acad. Publishers GmbH. 1994. V. 12. № 1. 53 p.
- Pliszka B., Redowicz M.J., Stepkowski D. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2001. V. 281. P. 924–928.
- Borejdo J., Ushakov D.S., Moreland R., et al. // Biochemistry. 2001. V. 40. P. 3796–3803.
- Lowey S., Saraswat L.D., Liu H., et al. // J. Mol. Biol. 2007. V. 371. P. 902–913.
- Mrakovic-Zenic A., Oriol-Audit C., Reisler E. // Eur. J. Biochem. 1981. V. 115. P. 565–570.
- Levitsky D.I., Nikolaeva O.P., Vedenkina N.S., et al. // Biomed. Sci. 1991. V. 2. № 2. P. 140–146.
- Abillon E., Bremier L., Cardinaud R. // Biochim. Biophys. Acta. 1990. V. 1037. P. 394–400.
- Markov D.I., Pivovarova A.V., Chernik I.S., et al. // FEBS Lett. 2008. V. 582. № 10. P. 1407–1412.
- Trayer H.R., Trayer I.P. // Biochemistry. 1988. V. 27. P. 5718–5727.
- Nikolaeva O.P., Orlov V.N., Bobkov A.A., Levitsky D.I. // Eur. J. Biochem. 2002. V. 269. № 22. P. 5678–5688.
- Shakirova L.I., Mikhailova V.V., Siletskaya E.I., et al. // J. Muscle Res. Cell Motil. 2007. V. 28. P. 67–78.

УДК 577.1 577.15

Механизм термоинактивации дрожжевой формиаатдегидрогеназы при различной ионной силе и рН среды

В. И. Тишков^{1,2,3,*}, С. В. Угланова^{1,4}, В. В. Федорчук¹, С. С. Савин^{2,3}¹Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1–3²Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071, Москва, Ленинский проспект, 33³ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», 109559, Москва, Цимлянская ул., 16, оф. 96⁴Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4

*E-mail: vitishkov@gmail.com

Поступила в редакцию 11.05.2010 г.

РЕФЕРАТ Исследована кинетика термоинактивации рекомбинантной формиаатдегидрогеназы дикого типа из дрожжей *Candida boidinii* (CboFDH) в диапазоне температур 53–61°C при рН 6.0, 7.0, 8.0 и различных концентрациях фосфатного буфера и субстрата формиаата натрия. Показано, что потеря активности фермента протекает по мономолекулярному механизму, а наблюдаемые значения активационных параметров ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger характерны для процесса разворачивания белковой глобулы. Оптимальными условиями для стабильности фермента являются рН 7.0 и высокие концентрации буферного раствора или субстрата формиаата натрия.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА формиаатдегидрогеназа, *Candida boidinii*, термоинактивация, стабилизация, ионная сила.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ФДГ – NAD⁺-зависимая формиаатдегидрогеназа, PseFDH – ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp.101, PseFDH GAV – мутантная ФДГ из *Pseudomonas* sp.101 версии GAV, CboFDH – ФДГ из дрожжей *Candida boidinii*.

ВВЕДЕНИЕ

NAD⁺-зависимая формиаатдегидрогеназа (КФ 1.2.1.2, ФДГ) принадлежит к суперсемейству D-специфичных дегидрогеназ 2-гидроксикислот [1]. В силу простоты катализируемой реакции – прямой перенос гидрид-иона в активном центре между формиаатом и C4-атомом никотинамидного кольца без стадий кислотно-основного катализа – ФДГ рассматривается как модельная система для изучения особенностей каталитического механизма ферментов всего суперсемейства.

Наиболее изученными являются ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp.101 (PseFDH) и дрожжей *Candida boidinii* (CboFDH). Исследование этих ферментов началось практически одновременно в начале 70-х годов прошлого века. В настоящее время получено большое количество мутантных форм этих ферментов [2], с помощью методов рентгеноструктурного анализа определены их четвертичные структуры [3–5]. Большой интерес также представляют ФДГ растений, которые локализованы в митохондриях. В нашей лаборатории были созданы штаммы *Escherichia coli* – продуценты растительных рекомбинантных ФДГ из *Arabidopsis thaliana* и сои *Glycine max* [6]. Недавно были получены кристаллы и определены структуры этих ФДГ [7].

Одной из важнейших характеристик фермента является его температурная стабильность. Этот параметр очень важен для практического применения. Для ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp.101 нами были проведены систематические

исследования по термоинактивации как фермента дикого типа, так и его мутантов при различных температурах, рН и концентрациях фосфатного буфера [2, 8]. Было показано, что при увеличении ионной силы раствора зависимость наблюдаемой константы скорости инактивации проходит через максимум и при высоких концентрациях фосфатного буфера наблюдается существенная (в несколько раз) стабилизация фермента [8]. Для ФДГ из дрожжей *C. boidinii* в литературе такой информации нет, хотя косвенные данные позволяют предполагать, что влияние среды на стабильность CboFDH может быть более сильным. Например, этот фермент теряет более половины активности за несколько дней при хранении при +4°C в 0.1 М фосфатном буфере, рН 7.0, поэтому для длительного хранения препаратов CboFDH фермент помещают в 40% глицерин при -20°C. В то же время в реальном процессе получения *трет-L*-лейцина при 25–30°C в проточном мембранном реакторе фермент сохраняет активность в течение нескольких недель [9]. Процесс протекает при высоких концентрациях субстрата CboFDH формиаата аммония, и можно полагать, что его присутствие обеспечивает повышение стабильности этого фермента.

Цель данной работы – проведение систематических исследований стабильности рекомбинантной CboFDH дикого типа при повышенной температуре в диапазоне рН 6.0–7.0 и при различных концентрациях фосфатного буфера и субстрата фермента формиаата натрия.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали препараты рекомбинантной формиатдегидрогеназы из дрожжей *Candida boidinii* дикого типа. Препаративную наработку биомассы клеток *E. coli* BL21(DE3)/pCboFDH, экспрессирующих ФДГ *C. boidinii*, проводили при 25°C в специальных качалочных колбах с отбойниками объемом 250 мл или 1 л (50 или 250 мл среды соответственно, содержащей 16 г/л триптона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 1 г/л хлорида натрия, 1.5 г/л однозамещенного фосфата натрия, 1 г/л двузамещенного фосфата калия, 100 мкг/мл ампициллина и 25 мкг/мл хлорамфеникола). Объем посевного материала составлял 10–15% от общего объема среды. Индуктор биосинтеза ФДГ – лактозу – добавляли до конечной концентрации 20 мг/мл по достижении поглощения суспензии клеток при 600 нм (A_{600}) 0.5–0.7. Затем клетки культивировали при максимальной аэрации в течение ночи. Клетки осадили центрифугированием на центрифуге Beckman J-21 (США) при 8000 об/мин в течение 20 мин при 4°C. Очистку CboFDH, экспрессированной в клетках *E. coli*, проводили по стандартной методике, разработанной для ФДГ из *Pseudomonas* sp.101 [10]. Процедура очистки фермента включала: разрушение клеток (10% w/v суспензия в 0.1 М калий-фосфатном буфере, 0.02 М EDTA, pH 8.0) с помощью ультразвукового дезинтегратора Braun Sonic (Германия) при 0°C, высаживание части балластных белков сульфатом аммония (35% от насыщения), гидрофобную хроматографию на системе FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) фирмы "Pharmacia" (Швеция) с использованием носителя Phenyl Sepharose Fast Flow той же фирмы и гель-фильтрацию на колонке с Сефакрилом S200. Полученные препараты были не менее 95% чистоты согласно данным аналитического электрофореза в 12% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях.

Определение активности формиатдегидрогеназ

Активность ФДГ определяли спектрофотометрически по накоплению NADH при длине волны 340 нм ($\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) на спектрофотометре Shimadzu UV 1601PC при 30°C в 0.1 М натрий-фосфатном буфере, pH 7.0. Концентрации NAD⁺ и формиата натрия в кювете были насыщающими и составляли 1.5 мМ и 0.3 М соответственно.

Исследование термоинактивации рекомбинантной CboFDH

Термостабильность фермента измеряли в натрий-фосфатном буфере заданной концентрации в диапазоне 0.01–1.5 М (pH 6.0–8.0), содержащем 0.01 М EDTA и, в зависимости от типа эксперимента, 0.1–2.5 М формиата натрия. Для каждого эксперимента готовили серию из пластиковых пробирок объемом 1.5 мл по 100 мкл раствора фермента (0.2–0.25 мг/мл) в каждой. Пробирки помещали в предварительно прогретый до необходимой температуры водный термостат (53–61°C, точность термостатирования $\pm 0.1^\circ\text{C}$). В определенные моменты времени отбирали по одной пробирке и переносили в лед на 5 мин, после чего пробирку центрифугировали в течение 3 мин при 12000 об/мин на центрифуге Eppendorf 5415D. Остаточную активность ФДГ измеряли как описано выше. Константу скорости термоинактивации $k_{\text{ин}}$ определяли как тангенс угла наклона прямой зависимости натурального логарифма величины

остаточной активности от времени (полулогарифмические координаты $\ln(A/A_0) - t$) методом линейной регрессии, используя программу «Origin 7.0».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние pH на скорость термоинактивации рекомбинантной ФДГ из *C. boidinii*

В ранее проведенных исследованиях для ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp.101 при температурах выше 37°C [2, 8] было показано, что:

- 1) процесс термоинактивации является необратимым;
- 2) зависимость потери ферментативной активности от времени соответствует кинетике реакции первого порядка;
- 3) наблюдаемая константа скорости инактивации первого порядка не зависит от концентрации фермента, т.е. инактивация бактериальных ФДГ при повышенных температурах является истинно мономолекулярным процессом.

Термоинактивация рекомбинантной CboFDH была исследована в диапазоне температур 53–61°C и значениях pH 6.0, 7.0 и 8.0. На рис. 1 представлены зависимости величин остаточной ферментативной активности от времени при различных температурах в 0.1 М фосфатном буфере, pH 6.0.

Как видно из рис. 1, эти зависимости линейны в полулогарифмических координатах ($\ln(A/A_0) - t$). Величина тангенса наклона прямых (т.е. константа скорости инактивации $k_{\text{ин}}$) не зависит от концентрации фермента в диапазоне концентраций 0.08–1.5 мг/мл. Линейный характер зависимостей остаточной ферментативной активности от времени в полулогарифмических координатах и постоянное значение наблюдаемой константы скорости инактивации при различных концентрациях фермента указывают на то, что термоинактивация CboFDH, как и в случае бактериальных ферментов, является мономолекулярным процессом, т.е. происходит в одну стадию без предварительной

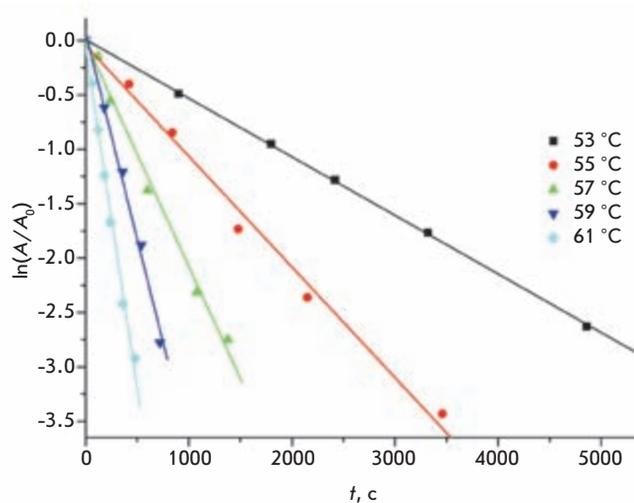


Рис. 1. Зависимость остаточной активности CboFDH от времени в координатах $\ln(A/A_0) - t$ при нескольких температурах (0.1 М натрий-фосфатный буфер, pH 6.0).

Таблица 1. Наблюдаемые константы скорости термоинактивации рекомбинантной ФДГ из *S. boidinii* в 0.1 М фосфатном буфере при различных значениях рН

рН	$k_{ин} \cdot 10^6, c^{-1}$				
	53 °С	55 °С	57 °С	59 °С	61 °С
6.0	539±4	1020±50	2070±80	3800±200	6200±200
7.0	28±1	97±3	370±20	1050±50	2260±90
8.0	290±9	1000±10	2570±40	6350±200	12000±400

Таблица 2. Значения активационных параметров процесса термоинактивации SboFDH при различных значениях рН

рН	$\Delta H^\ddagger, кДж \cdot моль^{-1}$	$\Delta S^\ddagger, Дж \cdot К^{-1} \cdot моль^{-1}$
6.0	280±9	500±30
7.0	500±30	1360±90
8.0	420±30	1240±80

диссоциации димерной молекулы фермента на отдельные субъединицы.

Исследование кинетики потери активности рекомбинантной SboFDH при рН 7.0 и 8.0 показало, что при этих рН термоденатурация фермента также протекает по мономолекулярному механизму. В табл. 1 приведены значения наблюдаемых констант первого порядка скорости инактивации рекомбинантной ФДГ из дрожжей *S. boidinii* в 0.1 М натрий-фосфатном буфере при различных рН.

Следует отметить более высокую стабильность бактериальных ФДГ по сравнению с SboFDH. Например, при рН 7.0 и 61 °С константа скорости инактивации SboFDH составляет $2.26 \times 10^{-3} c^{-1}$, в то время как соответствующая константа для PseFDH дикого типа при этой температуре равна $1.3 \times 10^{-4} c^{-1}$ [2], что почти в 20 раз меньше.

Определение активационных параметров процесса термоинактивации SboFDH

Истинно мономолекулярный характер процесса инактивации дрожжевой ФДГ во всем диапазоне исследованных температур и рН среды позволяет применить теорию активированного комплекса для анализа этого процесса.

Согласно теории активированного комплекса, уравнение, описывающее зависимость наблюдаемой константы скорости первого порядка от температуры, имеет следующий вид:

$$k = \frac{k_B T}{h} \exp\left(-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}\right) = \frac{k_B T}{h} e^{\frac{\Delta S^\ddagger}{R}} e^{-\frac{\Delta H^\ddagger}{RT}}, \quad (1)$$

где k_B и h – постоянные Больцмана и Планка соответственно, R – универсальная газовая постоянная и T – температура в градусах Кельвина, ΔG^\ddagger , ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger – изменения энергии, энтальпии и энтропии активации соответственно.

Уравнение (1) можно преобразовать к линейному виду:

$$\ln\left(\frac{k}{T}\right) = \ln\left(\frac{k_B}{h}\right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT} = const - \frac{\Delta H^\ddagger}{R} \frac{1}{T},$$

где $const = \ln\left(\frac{k_B}{h}\right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R}$.

Как видно из рис. 2, полученные при трех значениях рН экспериментальные зависимости наблюдаемой константы скорости инактивации от температуры в координатах $\ln(k_{ин}/T) - 1/T$ представляют собой прямые, т.е. эти зависимости действительно описываются уравнением теории активированного комплекса. Из тангенса угла наклона прямых на рис. 2 были рассчитаны соответствующие значения ΔH^\ddagger .

Величина ΔS^\ddagger может быть получена аппроксимацией прямой на рис. 2 на нулевое значение оси ординат. Однако данная процедура приводит к очень большим ошибкам, поскольку аппроксимация проводится на очень удаленное расстояние, и из полученного значения отсекаемого отрезка необходимо вычесть величину $\ln(k_B/h)$. С гораздо большей точностью величина ΔS^\ddagger может быть получена из тангенса угла наклона зависимости ΔG^\ddagger от T согласно уравнению:

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger.$$

Для нахождения свободной энергии активации было использовано следующее выражение:

$$\Delta G^\ddagger = RT \left[\ln\left(\frac{k_B}{h}\right) - \ln\left(\frac{k}{T}\right) \right] = RT \ln\left(\frac{k_B T}{kh}\right).$$

Величины ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger для трех значений рН представлены в табл. 2.

В большинстве случаев инактивация фермента при повышенных температурах обусловлена денатурацией белковой глобулы. Термоденатурация является кооперативным процессом и должна сопровождаться увеличением значений ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger , превышающих соответствующие

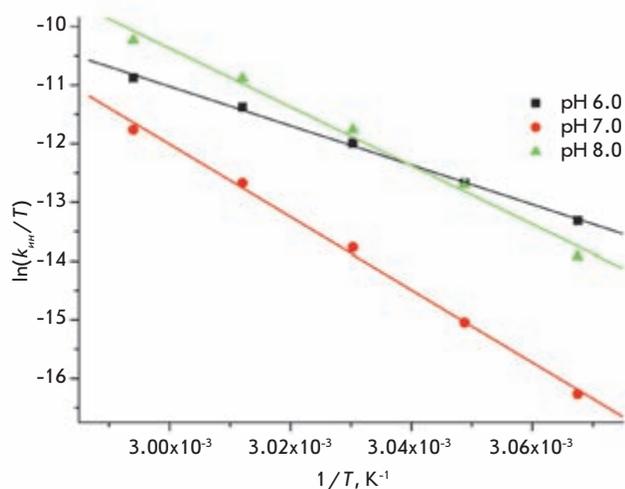


Рис. 2. Зависимость константы скорости инактивации SboFDH от температуры в координатах $\ln(k_{ин}/T) - 1/T$ в 0.1 М фосфатном буфере при различных значениях рН.

значения для химических реакций в десятки раз, что и наблюдается в случае полученных нами величин ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger для термоинактивации CboFDH (табл. 2). Следует отметить, что близкие значения активационных параметров были, например, получены при изучении различных бактериальных форматдегидрогеназ [8].

Как следует из полученных данных, pH оказывает большое влияние на процесс термоинактивации рекомбинантной ФДГ из *C. boidinii*. Фермент наиболее стабилен при pH 7.0. Увеличение или уменьшение величины pH приводит к резкой дестабилизации белковой глобулы и, как следствие, к росту значения $k_{ин}$ в 3–20 раз в зависимости от температуры (табл. 1). Особо следует отметить разный ход температурной зависимости величины $k_{ин}$ при различных значениях pH. Наиболее быстро она меняется при pH 7.0 и наиболее медленно – при pH 6.0 (рис. 2). По-видимому, это связано с изменением состояния ионизации заряженных групп в белковой глобуле (например, потеря положительного заряда на остатке гистидина при pH ≥ 7.0 или появление положительного заряда на остатке гистидина при pH ≤ 7.0), что приводит к уменьшению количества противоположно заряженных групп, участвующих в электростатических взаимодействиях или возникновению отталкивания между одноименно заряженными остатками. Например, согласно данным рентгеноструктурного анализа, в молекуле CboFDH ND1-атом остатка His57 находится на расстоянии всего 2.82 Å от NZ-атома аминогруппы остатка Lys2 в той же субъединице, а расстояние между ND1-атомом остатка His126 одной субъединицы и NE-атомом гуанидиновой группы остатка Arg136 другой субъединицы составляет 3.61 Å (структура 2FSS.PDB). В молекуле апо-CboFDH также возможно наличие четырех электростатических связей между остатками His и карбоксильными группами остатков Asp и Glu на расстоянии до 4 Å. Кроме того, не следует забывать, что изменение состояния ионизации даже одной группы может привести к значительным конформационным изменениям всей белковой глобулы.

Зависимость термостабильности CboFDH от концентрации фосфат-иона

Как отмечалось выше, электростатические взаимодействия играют важнейшую роль в поддержании нативной конформации белков. Эффективность таких взаимодействий сильно ослабляется в растворах с высокой ионной силой. Для выяснения роли электростатических взаимодействий в стабильности ФДГ из дрожжей *C. boidinii* был изучен процесс термоинактивации фермента в растворах с различными концентрациями фосфата. Фосфат-ион был выбран из-за большого размера, препятствующего проникновению внутрь белковой глобулы, поэтому он должен разрушать только ионные пары на поверхности белка, не влияя на структуру самой глобулы фермента. Для сравнения была исследована такая же зависимость для мутантной ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp.101 PseFDH GAV при pH 8.0.

На рис. 3 представлена зависимость константы скорости термоинактивации форматдегидрогеназы из дрожжей *C. boidinii* от концентрации фосфатного буфера при pH 7.0. Вначале при увеличении ионной силы раствора наблюдает-

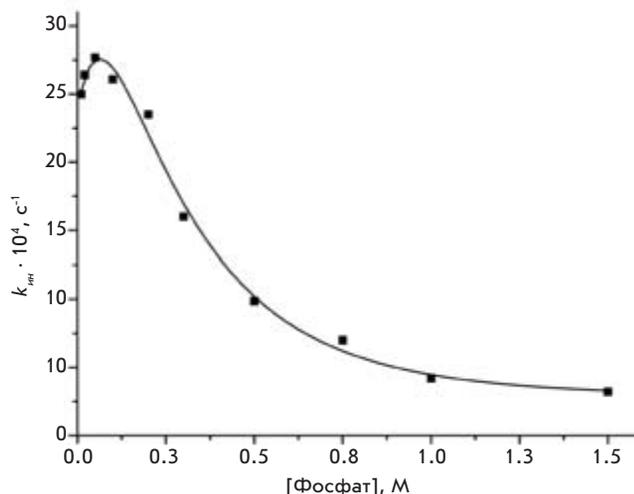


Рис. 3. Зависимость константы скорости инактивации CboFDH от концентрации фосфат-иона (0.01–1.5 М натрий-фосфатный буфер, pH 7.0, 61°C).

ся уменьшение стабильности фермента, что можно объяснить повышением диэлектрической проницаемости среды и ослаблением электростатических взаимодействий. Однако при больших концентрациях соли стабильность начинает повышаться (общая стабилизация примерно в 7 раз). Аналогичная зависимость наблюдается и при pH 8.0, однако эффект стабилизации намного выше – почти в 100 раз.

Влияние высоких концентраций фосфатного буфера на термостабильность рекомбинантной PseFDH дикого типа была изучена ранее [8]. В случае этого фермента максимальное значение константы скорости инактивации наблюдалось при более высокой концентрации фосфатного буфера – 0.2 М, и величина эффекта дестабилизации была выше (в 2 раза), чем в случае CboFDH (около 11%), а при высоких концентрациях фосфатного буфера (>1 М) эффект стабилизации по сравнению с низкими концентрациями (0.05 М) вообще не наблюдался.

На рис. 4 представлена зависимость константы скорости инактивации от концентрации фосфат-иона для мутантной ФДГ из *Pseudomonas* sp.101 версии GAV (PseFDH GAV) при pH 8.0 и 61°C. В случае PseFDH GAV наблюдается гораздо более низкая степень стабилизации при увеличении концентрации соли – всего в 3 раза (для CboFDH при pH 8.0 – 100-кратная стабилизация), однако запаса «прочности» по термостабильности PseFDH GAV хватает настолько, что даже 100-кратного эффекта стабилизации CboFDH недостаточно для того, чтобы она смогла сравниться по стабильности с бактериальным ферментом.

Данные по влиянию концентрации фосфатного буфера на константу скорости инактивации CboFDH дикого типа и анализ четвертичной структуры фермента позволяют объяснить высокий эффект стабилизации фермента при концентрации фосфатного буфера 0.1 М за счет мутации Arg178Ser [11]. Эта замена приводит к увеличению стабильности фермента более чем в 3 раза [2]. Дело в том, что рядом с ним расположены еще два остатка Arg в положениях 174 и 182 (рис. 5А). Их положительно заряженные

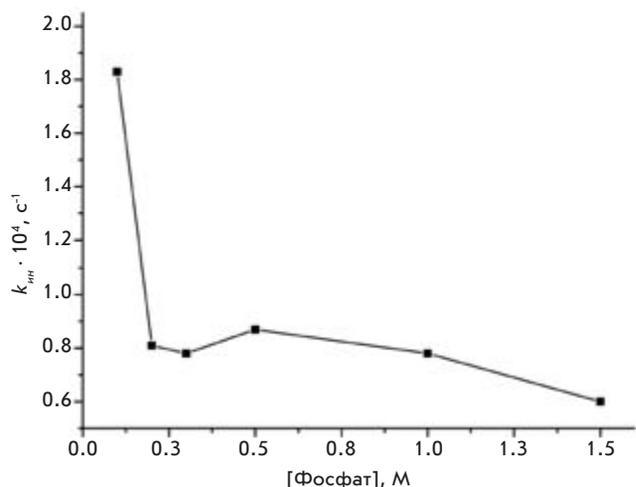


Рис. 4. Зависимость константы скорости инактивации PseFDH GAV от концентрации фосфат-иона (0.1–1.5 М натрий-фосфатный буфер, pH 8.0, 61°C).

гуанидиновые группы расположены от таковой у Arg178 на расстоянии 4.05 и 4.78 Å соответственно. Это достаточно большие расстояния, и в случае одного положительного заряда сила отталкивания будет не очень велика, но положительных зарядов два, вследствие чего эффективность отталкивания сильно возрастает. Замена Arg178Ser приводит к удалению электростатического отталкивания положительных зарядов и образуется новая водородная связь между остатками Arg182 и Ser178 (рис. 5Б), что и обеспечивает высокий эффект стабилизации при этой замене. При увеличении концентрации фосфатного буфера происходит экранирование положительных зарядов отрицательно заряженными ионами фосфата.

Сравнение аминокислотных последовательностей ФДГ из бактерий, высших растений, дрожжей и микроскопических грибов свидетельствует, что остатки аргинина в положениях, соответствующих в CboFDH остаткам Arg174 и 182, являются консервативными для всех вышеуказанных ферментов (см. рис. 1 в работе [2]). Более того, остаток Arg174 входит в участок (G/A)AGIRG, являющийся характерным «фингерпринтом», на основании которого выявляют наличие коферментсвязывающего домена в дегидрогеназах. Методом рентгеноструктурного анализа для ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp.101 [3] и *Moraxella* sp.C2 было показано, что остаток аргинина из «фингерпринтного» участка (Arg202 в бактериальных ферментах) участвует в связывании NAD⁺, взаимодействуя с его пирофосфатной группой. Вполне очевидно, что замена этих двух консервативных остатков Arg (особенно Arg174) должна приводить к ухудшению его каталитических свойств. В ФДГ из дрожжей и микроскопических грибов остаток Arg178 является абсолютно консервативным. В то же время в бактериях и высших растениях у ФДГ в положении, соответствующем положению остатка Arg178 в аминокислотной последовательности CboFDH, встречаются соответственно или остаток Ala, или остаток Leu. Причина, по которой в ФДГ из дрожжей и микроскопических грибов природа «поместила» в это положение невыгодный остаток аргинина неизвестна, и для ответа на этот вопрос необходимы дополнительные исследования.

Зависимость термостабильности CboFDH от концентрации формиат-иона

При практическом применении формиатдегидрогеназы в системах ферментативного синтеза для достижения большого количества циклов кофермента необходимо использовать как можно более высокие концентрации субстратов (до 2–3 М), в том числе и формиата. Поэтому нами также была изучена кинетика термоинактивации CboFDH при различных концентрациях формиата натрия при двух

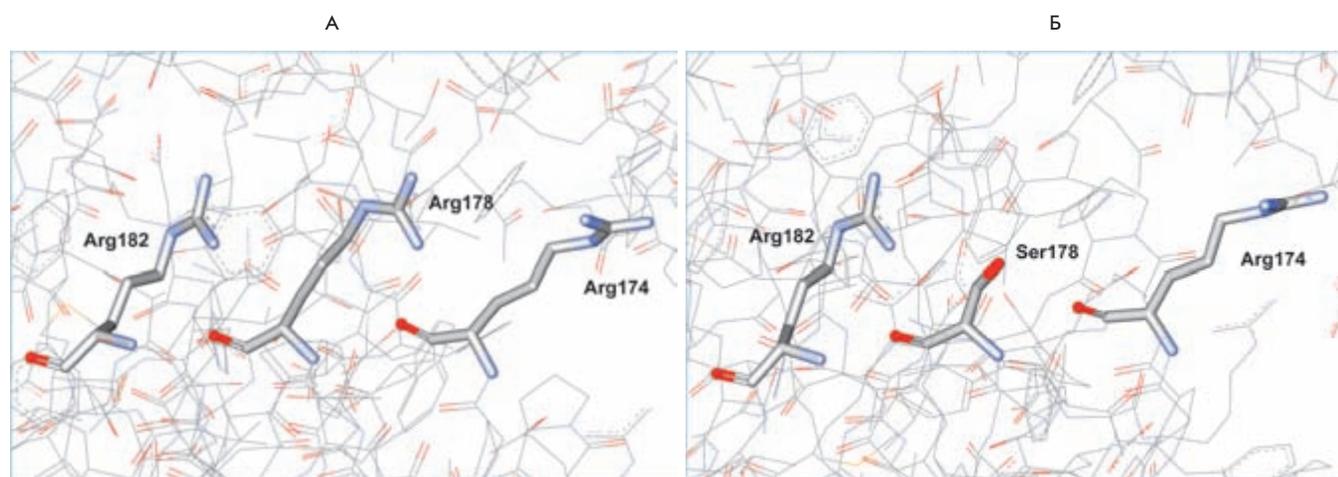


Рис. 5. А — Взаимная пространственная ориентация остатков Arg174, 178 и 182 в апоформе формиатдегидрогеназы из *C. boidinii* (структура 2FSS.PDB). Б — Удаление электростатического отталкивания и образование новой водородной связи за счет аминокислотной замены Arg178Ser в субъединице CboFDH.

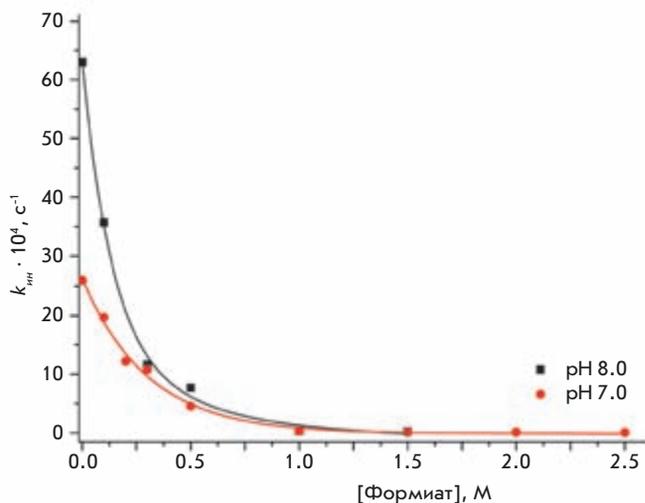
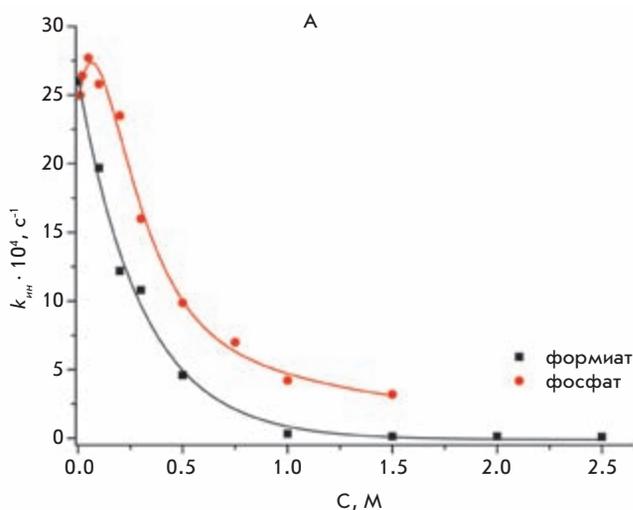


Рис. 6. Зависимость константы скорости инактивации СboFDH от концентрации формиат-иона в 0.1 М натрий-фосфатном буфере при pH 7.0 и 61°C и при pH 8.0 и 59°C.

значениях pH – 7.0 и 8.0 (рис. 6), поскольку именно в этом диапазоне в основном и проводят процессы ферментативного синтеза с помощью дегидрогеназ. Как видно из рис. 6, при высоких концентрациях формиата натрия наблюдается очень сильная стабилизация фермента. Особенно хорошо этот эффект виден при концентрациях формиата натрия до 1.5 М. Как и в случае зависимости константы скорости инактивации от концентрации фосфат-иона, эффект стабилизации более ярко выражен при pH 8.0, чем при pH 7.0 (рис. 6).

Сравнение зависимостей констант скоростей инактивации от концентрации фосфата и формиата (рис. 7А),



полученных при pH 7.0 и 61°C, показывает, что формиат стабилизирует СboFDH лучше, чем фосфат, причем для достижения эффекта стабилизации требуются намного меньшие концентрации субстрата. Однако пересчет концентрации фосфата на соответствующую ей ионную силу показывает, что в зависимости от ионной силы ход изменения константы скорости инактивации в случае формиата и фосфата идентичен, причем наблюдаемая зависимость описывается простой экспонентой, как и в случае формиат-иона (рис. 7Б). Этот факт свидетельствует об универсальности эффекта стабилизации СboFDH под действием ионной силы. Более высокая эффективность стабилизации в случае формиата, по-видимому, связана с тем, что формиат-ион в силу меньшего размера способен более глубоко проникать внутрь белковой глобулы или специфически связываться.

Данные по стабилизации СboFDH в присутствии высоких концентраций формиата могут быть использованы на практике при проведении процессов ферментативного синтеза хиральных соединений. Кроме того, СboFDH можно хранить без потери активности в буферных растворах с высокой концентрацией соли при +4°C, а не при -20°C в 40% глицерине, как это делается сейчас. Высокая концентрация соли также снижает концентрацию растворенного кислорода, что обеспечивает дополнительную защиту фермента от инактивации за счет окисления сульфгидрильных групп остатков цистеина. В нашем случае препараты рекомбинантной СboFDH дикого типа хранились в течение 9 мес. без потери активности при +4°C в растворе сульфата аммония (35% от насыщения) и 0.1 М фосфатном буфере, pH 7.0.

В заключение отметим, что результаты по прямому сравнению термостабильности бактериальной и дрожжевой ФДГ, основанные на исследовании кинетики инактивации, очень хорошо согласуются с данными по изучению термостабильности этих ферментов с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии, которые были

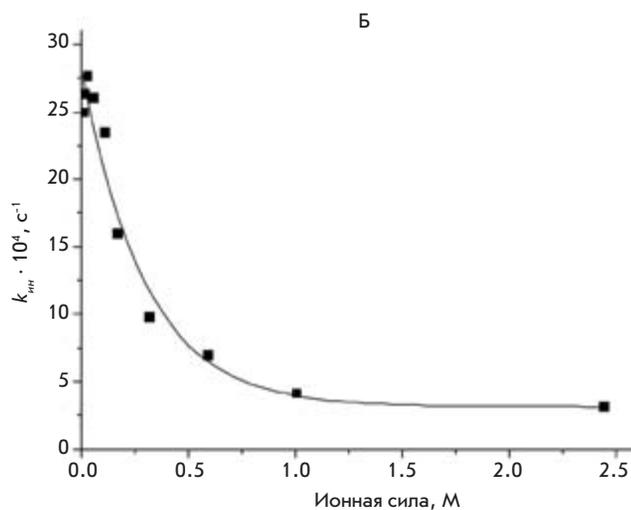


Рис. 7. А — Зависимость константы скорости термоинактивации СboFDH от концентрации фосфатного буфера и концентрации субстрата формиата натрия. pH 7.0, 61°C. Б — Зависимость константы скорости термоинактивации СboFDH от концентрации фосфатного буфера, пересчитанной на величину ионной силы. 0.01–1.5 М натрий-фосфатный буфер, pH 7.0, 61°C.

получены в нашей лаборатории [12] и в которых были использованы те же препараты рекомбинантной CboFDH, что и в этой работе.

Таким образом, в данной работе впервые были выполнены систематические исследования термостабильности форматдегидрогеназы из дрожжей *C. boidinii*, результаты которых позволили провести прямое сравнение с ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp.101. Полученные данные

свидетельствуют, что механизм инактивации ферментов одинаковый, однако влияние среды на их стабильность разное. ●

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 08-04-01589-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Vinals C., Depiereux E., Feytmans E. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1993. V. 192. P. 182–188.
- Tishkov V.I., Popov V.O. // Biomol. Eng. 2006. V. 23. P. 89–110.
- Lamzin V.S., Dauter Z., Popov V.O., et al. // J. Mol. Biol. 1994. V. 236. P. 759–785.
- Филиппова Е.В., Поляков К.М., Тихонова Т.В. и др. // Кристаллография. 2006. Т. 51. С. 663–667.
- Schirwitz K., Schmidt A., Lamzin V.S. // Protein Sci. 2007. V. 16. P. 1146–1156.
- Садыхов Э.Г., Серов А.Е., Ясный И.Е. и др. // Вестн. МГУ. Сер. 2. Химия. 2006. Т. 47. С. 31–34.
- Шабалин И.Г., Серов А.Е., Скиргелло О.Е. и др. // Кристаллография. 2010. Т. 55. № 5. Принята в печать.
- Федорчук В.В., Галкин А.Г., Ясный И.Е. и др. // Биохимия. 2002. Т. 67. С. 1385–1393.
- Bommarius A.S., Schwarm M., Stingl K., et al. // Tetrahedron-Asymmetry. 1995. V. 6. P. 2851–2888.
- Rojkova A.M., Galkin A.G., Kulakova L.B., et al. // FEBS Lett. 1999. V. 445. P. 183–188.
- Felber S. Optimierung der NAD-abhängigen Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* für den Einsatz in der Biokatalyse: PhD Thesis. Düsseldorf: Heinrich-Heine University of Düsseldorf, 2001. URL: <http://diss.uni-duesseldorf.de/ebib/diss/file?dissid=78>
- Sadykhov E., Serov A., Voinova N., et al. // Appl. Biochem. Microbiol. 2006. V. 42. P. 236–240.

УДК 577.352

Анионные липиды как детерминанты связывания цитотоксинов из яда змей на поверхности клеточной мембраны

А. Г. Коншина^{1,*}, И. А. Болдырев¹, А. В. Омельков², Ю. Н. Уткин¹, Р. Г. Ефремов¹¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Макляя, 16/10²Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, факультет технологии органических веществ и химико-фармацевтических средств

*E-mail: nastya@nmr.ru

Поступила в редакцию 19.05.2010 г.

РЕФЕРАТ Цитотоксические свойства цитотоксинов (ЦТ) из яда змей опосредованы их взаимодействием с мембраной клеток. Известно, что гидрофобный паттерн, включающий окончания петель I–III и окруженный полярными остатками, является мембраносвязывающим мотивом ЦТ. Однако этого недостаточно для объяснения различий в активности среди представителей семейства ЦТ, сходных как по последовательности, так и по типу пространственной укладки. По-прежнему остается неясным механизм дальнейшего взаимодействия с мембраной, приводящий к формированию пор и гибели клетки. Имеющиеся в литературе экспериментальные данные о специфическом взаимодействии ЦТ с низкомолекулярными анионными компонентами (сульфатид), входящими в состав бислоя, указывают на наличие на поверхности молекулы токсина участков связывания соответствующих лигандов. В настоящей работе мембранолитические свойства ЦТ I, ЦТ II (*Naja oxiana*) и ЦТ 4 (*Naja kaouthia*), принадлежащих к разным структурно-функциональным типам (Р и S), оценивали по интенсивности вытекания флуоресцентного красителя кальцеина из липосом, содержащих липид фосфатидилсерин (ФС) в качестве анионного компонента. С помощью метода молекулярного докинга выявлены и охарактеризованы три потенциальных сайта связывания полярной головки ФС молекулами ЦТ. На основании полученных данных выдвинуто предположение о наличии специфического взаимодействия ЦТ с одним или несколькими анионными липидами (в частности, ФС) в составе мембраны, что может повышать эффективность взаимодействия ЦТ с липидным бислоем клеточной мембраны.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА цитотоксины, фосфатидилсерин, липидные мембраны, молекулярный докинг, флуоресцентная спектроскопия.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ЦТ – цитотоксин(ы), ФС – фосфатидилсерин; РКС – протеинкиназа С, Сф – сульфатид, ПОФХ – пальмитоилолеилфосфатидилхолин, 6-CF – 6-карбокCIFлуоресцеин, L/P – соотношение липид/белок, ДФХ – додецилфосфохолин, ЯМР – ядерный магнитный резонанс, гФС – полярная головка липида фосфатидилсерина, PDB – Protein Data Bank (банк данных белковых структур).

ВВЕДЕНИЕ

Одна из характерных особенностей молекул цитотоксинов из яда змей – их способность оказывать токсическое действие на различные типы клеток [1]. Цитотоксины (реже кардиотоксины, ЦТ) – небольшие основные белки, принадлежащие семейству «трехпетельных» токсинов. Вторичная структура ЦТ состоит из 2 β-слоев, включающих 2 и 3 антипараллельных β-тяжа, и стабилизирована 4 дисульфидными связями. Наибольшие различия в аминокислотной последовательности и пространственной структуре представителей обширного семейства ЦТ наблюдаются в петлевых участках с нерегулярной структурой, прежде всего в петлях I и II. Деление ЦТ на S- или P-тип в зависимости от наличия в петле II консервативного остатка S28

или P30, соответственно, коррелирует с различиями в их функциональной активности [2]. Долгое время считалось, что ЦТ неспецифически взаимодействуют с клеточной мембраной. Способность ЦТ P-типа сильнее взаимодействовать с бислоем (по сравнению с ЦТ S-типа) связывают с большей гидрофобностью петли II и, как следствие, с наличием на поверхности токсина протяженной области, формируемой гидрофобными окончаниями трех петлевых участков. Обладая амфифильными свойствами (гидрофобные окончания петель I–III фланкированы поясом положительно заряженных остатков), молекулы ЦТ встраиваются в липидный бислой и образуют в нем структурные дефекты по типу поры [3–6], что приводит к гибели клетки. Ранее был предложен ряд моделей, объясняющих меха-

низ действия ЦТ, приводящий к нарушению целостности бислоя и последующему лизису [7]. Позже было показано, что некоторые ЦТ, в том числе ЦТ АЗ (*Naja atra*), способны к интернализации внутрь клетки и взаимодействию с внутриклеточными органеллами, митохондриями [8] и лизосомами [9].

Ввиду широкого спектра биологической активности, в том числе влияния на функциональное состояние различных мембранных белков, таких, как протеинкиназа С (РКС), Na^+, K^+ -АТФаза, интегрин, гипотезы о существовании специфических мишеней для ЦТ и молекулярные детали механизма взаимодействия токсинов с мембраной актуальны и остаются предметом дискуссий [7, 10–12].

Поиск потенциальных мишеней действия ЦТ выявил ряд анионных низкомолекулярных лигандов (олигосахариды на основе гепарина, производные АТФ, сульфатид), взаимодействие которых с определенными участками поверхности токсина подтверждено ЯМР и рентгеноструктурными исследованиями [13–17]. Комплексный подход с использованием метода флуоресцентной спектроскопии на липосомах разного состава, а также экспериментов *in vivo* с применением моноклональных антител продемонстрировал наличие специфической мишени – полярной головки гликолипида сульфатида (Сф) – на поверхности мембраны кардиомиоцитов крысы, опосредующей токсическое действие ЦТ АЗ [17]. Учитывая то, что ЦТ действуют на разные типы клеток, а также тот факт, что модельные мембраны, не содержащие гликолипиды, тем не менее, эффективно лизируются токсинами [5, 18, 19], можно предположить, что ЦТ способны к специфическому взаимодействию и с другими анионными мембранными липидами, в том числе – с наиболее широко распространенным фосфатидилсерином (ФС). И хотя в норме данный липид локализован почти исключительно во внутреннем монослое клеточной мембраны, в ряде патологических процессов, при повреждении бислоя, ФС присутствует во внешнем монослое и может быть доступен для молекул цитотоксина. Ряд экспериментальных данных косвенно указывает на возможную конкуренцию между ЦТ и другими ФС-связывающими молекулами (РКС, тионин) за общий сайт на поверхности мембраны [10, 20, 21].

Предполагая, что ФС является специфической мишенью, опосредующей токсическое действие ЦТ на клетки, в настоящей работе мы изучили взаимодействие цитотоксинов S- (ЦТ I из *Naja oxiana*) и P-типа (ЦТ II из *Naja oxiana* и ЦТ 4 из *Naja kaouthia*) с пальмитоилолеилфосфатидилхолиновыми (ПОФХ) мембранами, в том числе содержащими ФС и Сф. Отметим, что ЦТ 4 (*N. kaouthia*) по первичной структуре является 100% аналогом ЦТ АЗ (*N. atra*). С помощью метода флуоресцентной спектроскопии исследована литическая активность данных ЦТ в отношении липосом разного состава. Для выявления потенциальных сайтов связывания ФС с молекулой ЦТ проведен молекулярный докинг полярной головки ФС в модели пространный структуры молекул токсинов, активных в отношении ФС-содержащих липосом. На основании полученных данных выдвинута гипотеза о двухстадийном специфическом взаимодействии токсина с бислоем, молекулярными детерминантами которого являются полярные

головки анионных липидов, взаимодействующие с определенными сайтами ЦТ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Флуоресцентная спектроскопия: исследование литической активности ЦТ в отношении ФС-содержащих липосом разного состава

Цитотоксины ЦТ I и ЦТ II выделяли из яда змеи *N. oxiana* по методике, описанной в работе [22], ЦТ 4 – из яда *N. kaouthia*, используя методику, описанную в работе [23], с последующей очисткой токсина методом обращенно-фазовой хроматографии. Структуру токсина подтверждали масс-спектрометрией с использованием метода пептидного картирования после гидролиза трипсином восстановленного и пиридилэтилированного производного токсина. Сф и ФС, выделенные из мозга быка в лаборатории химии липидов ИБХ РАН, а также синтетический ПОФХ (Avanti Polar Lipids, США) использовали для приготовления липосом состава: ПОФХ, ПОФХ/ФС5%, ПОФХ/ФС20%, ПОФХ/ФС35%, ПОФХ/ФС50%, ПОФХ/ФС70%, ПОФХ/Сф5% и ПОФХ/Сф62%. Растворы липидов необходимой концентрации в хлороформе с метанолом (1 : 1) смешивали, упаривали и высушивали под вакуумом. Полученные липидные пленки гидратировали буфером состава: 50 мМ Трис-НСl (рН 7.8), 30 мМ NaCl, 4 мМ EDTA и 100 мМ кальцеина. После инкубации в течение нескольких часов суспензия была подвергнута 10 циклам замораживания–оттаивания и затем продавлена 20 раз с помощью мини-экструдера (Avanti Polar Lipids, США) через поликарбонатный фильтр (NucleoPore, США) с размером пор 100 нм. Внешний краситель удаляли методом гель-фильтрации на сефарозной колонке CL-4B, уравновешенной буфером состава: 50 мМ Трис-НСl (рН 7.8), 110 мМ NaCl, 4 мМ EDTA. Кроме того, активность ЦТ 4 в отношении Сф-содержащих липосом (ПОФХ/Сф62%) была измерена в условиях, описанных в [6], состав буфера: 10 мМ Трис-НСl (рН 7.4), 75 мМ NaCl; 50 мМ 6-карбоксифлуоресцеина (6-СФ) в качестве флуорофора; соотношение липид/белок (L/P) ~62.

Степень повреждающего действия ЦТ на липосомальную мембрану оценивали спектрофотометрически по степени выхода флуорофора (*I*) из внутреннего объема липосом при добавлении в измеряемый объем (кварцевую кювету) аликвоты раствора токсина. Величину *I* (%) рассчитывали по формуле:

$$I = 100 \times (F - F_0) / (F_t - F_0),$$

где F_0 – интенсивность флуоресценции липосом без токсина (фоновый уровень);

F – интенсивность флуоресценции в присутствии токсина; F_t – интенсивность флуоресценции после разрушения липосом детергентом (Тритон X-100). Во всех измерениях, если это не оговорено особо, соотношение L/P в измеряемом объеме составляло 100. Интенсивность флуоресценции измеряли на длине волны 517 нм с возбуждением на 494 нм. Спектральная ширина щели при возбуждении и испускании составила 3 и 5 нм соответственно. Для каждого эксперимента регистрировали кинетику флуоресценции (около 40 мин) до выхода кривой зависимости *I* от време-

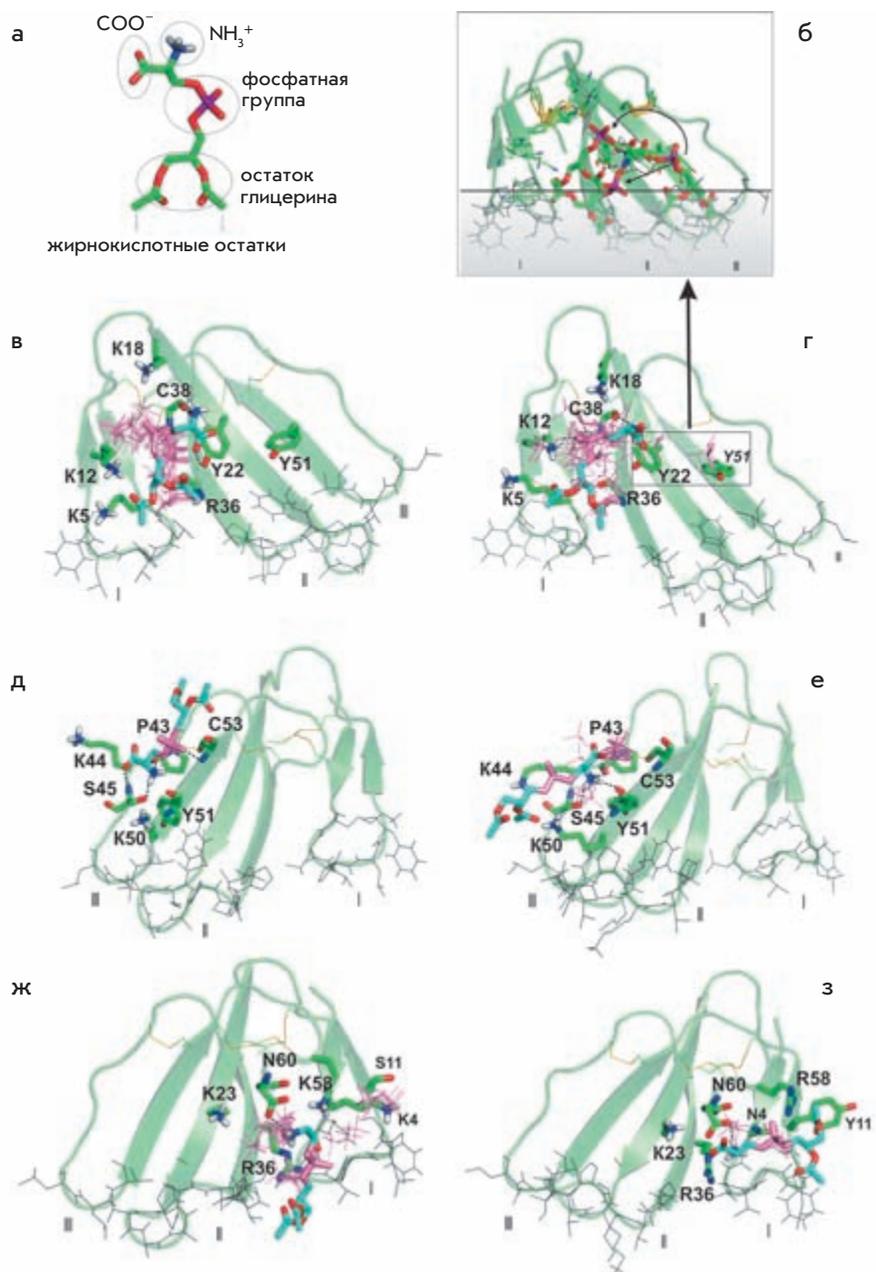


Рис. 1. а – Пространственная модель лиганда гФС, использованная в расчетах молекулярного докинга. Функциональные группы обозначены. б–з – Результаты молекулярного докинга ЦТ–гФС. Пространственные структуры комплексов белок–лиганд в сайте М молекул токсинов ЦТ 4 (б, г) и ЦТ II (в); сайте L3 ЦТ II (д) и ЦТ 4 (е); сайте L1 ЦТ II (ж) и ЦТ 4 (з). Трехмерные модели ЦТ даны в виде ленточных диаграмм с обозначением участков β-структуры в виде плоских широких стрелок. Гидрофобные остатки петель I–III (даны римскими цифрами), взаимодействующие с мембраной, атомы основной и/или боковой цепей остатков, образующих сайты, а также одна из предпочтительных конформаций гФС в сайте даны в проволочном представлении. Для остальных решений докинга, входящих в TOP10, указаны положения фосфатных групп гФС (даны в проволочном представлении), отражающие варибельность локализации гФС в каждом из сайтов. Аминокислотные остатки, образующие сайт связывания лиганда, указаны однобуквенным кодом с номером остатка. Пунктирными линиями указаны водородные связи лиганд–рецептор. Для молекул ЦТ окраска по типу атомов соответствует общепринятой схеме. Фосфатная группа и атомы углерода молекулы гФС окрашены в розовый и голубой цвета соответственно. б – Несколько вариантов ориентации гФС в сайте М_Y51 ЦТ 4, найденные в TOP10-решениях докинга. Стрелками указан возможный путь миграции гФС из сайта М_Y51 в направлении сайта М. Показана предполагаемая мода связывания токсина с мембраной (затененная область под горизонтальной линией).

ни на плато. Для контроля воспроизводимости результатов каждое измерение повторяли 2–3 раза. Все измерения проводили при комнатной температуре на спектрофлуориметре HITACHI F4000 (Япония).

Молекулярный докинг полярной головки ФС в ЦТ II и ЦТ 4

Поиск сайтов связывания ФС на молекулярной поверхности ЦТ проводили методом молекулярного докинга, используя программу GOLD 2.0 [24].

В ходе расчетов использовали кристаллографическую модель пространственной структуры ЦТ A3 из яда *N. atra*

(PDB код: 2VNI) [17] и ЯМР-модели ЦТ II, полученные в водном окружении (PDB код: 1CB9, модели: 1, 14, 18) [25] и в присутствии мицелл додецилфосфохолина (ДФХ) (PDB код: 1FFJ, модели: 1, 10) [4].

С целью учета конформационной подвижности рецептора в ходе докинга для каждого из исследуемых ЦТ рассматривали набор пространственных моделей, характеризующих динамическое поведение токсинов в средах разной полярности. Используя экспериментальные модели токсинов в качестве стартовых, репрезентативный набор соответствующих трехмерных моделей ЦТ 4 и ЦТ II был получен с помощью расчета молекулярной динамики

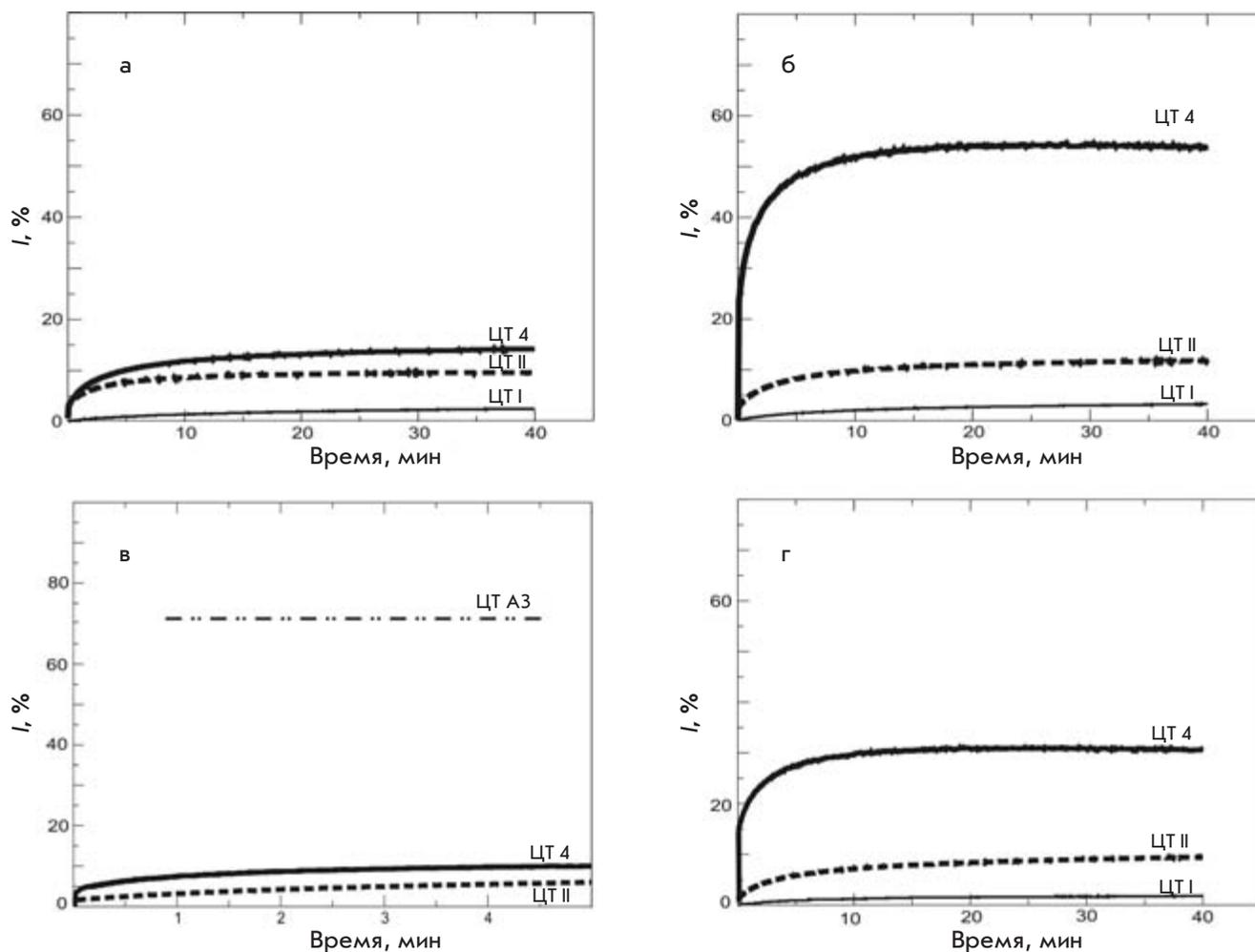


Рис. 2. Интенсивность вытекания флуорофора (кальцеин) из липосом состава ПОФХ (а), ПОФХ/ФС5% (б) и ПОФХ/Сф5% (г) в присутствии ЦТ I, ЦТ II (*N. oxiana*) и ЦТ 4 (*N. kaouthia*). в – Кинетика флуоресценции карбоксифлуоресцеина (6-CF) в первые минуты после добавления ЦТ 4 и ЦТ II. В данном эксперименте (в) состав буфера, флуоресцентный краситель, соотношение L/P = 62.5 и концентрация липид/токсин (10/0.16 мкМ) в измеряемом объеме повторяют условия работы [6]. Интенсивность флуоресценции 6-CF при действии ЦТ А3 (*N. atra*), зарегистрированная в работе [6], отмечена (_ _ _).

в воде и применения метода Монте-Карло для поиска низкоэнергетических состояний в присутствии неявно заданной мембраны (данные не опубликованы).

Полярная головка липида фосфатидилсерина (гФС), используемая в расчетах, включала все атомы полярной головки данного липида с CH_3 -группами вместо жирнокислотных остатков (рис. 1а). Докинг гФС осуществляли в 16 и 15 пространственных моделей ЦТ 4 и ЦТ II соответственно.

Для каждой модели ЦТ было получено по 50 комплексов (решений докинга), из которых 10 лучших по значению оценивающей функции «gold_score» [26] использовали для дальнейшего анализа. Таким образом, всего для ЦТ 4 и ЦТ II было отобрано 160 и 150 лучших решений (TOP10) соответственно. Сайты связывания гФС с ЦТ выявляли,

анализируя локализацию гФС на поверхности молекулы токсина и частоту встречаемости соответствующих комплексов в TOP10-решениях. Поскольку молекулярная поверхность гФС полярна, основной вклад в энергию комплексов липид-токсин вносят водородные связи и электростатические взаимодействия. Полученные семейства решений докинга анализировали по числу и характеру распределения водородных связей и ионных контактов (с расстоянием между соответствующими заряженными группами меньше 6 Å), выявляя ключевые остатки сайтов, вовлеченные во взаимодействие с гФС в большинстве комплексов.

Наличие данных видов межмолекулярных взаимодействий оценивали с помощью программ PLATINUM [27] и GROMACS 3.3.1 [28].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Флуоресцентные измерения: ЦТ-индуцированное вытекание красителя из липосом

Зависимость активности ЦТ от вида минорного (5%) анионного липида (ФС, Сф). В настоящей работе литическая активность ЦТ II (*N. oxiana*), ЦТ 4 (*N. kaouthia*) и ЦТ I (*N. oxiana*), относящихся к Р- и S-типу соответственно, была оценена по выходу органического красителя кальцеина из липосом состава ПОФХ, ПОФХ/ФС5% и ПОФХ/Сф5%. Как видно из рис. 2, ЦТ I (S-тип) практически не взаимодействует ни с нейтральными (ПОФХ), ни с содержащими минорные количества анионных липидов (ФС, Сф) липосомами. Интенсивность вытекания кальцеина (*I*) во всех случаях составила менее 5%. При добавлении в суспензию липосом ЦТ II (Р-тип) наблюдали увеличение интенсивности вытекания красителя (в сравнении с ЦТ I). При этом вне зависимости от состава липосом средние значения *I* составили не более 10% (рис. 2).

Как показали измерения флуоресценции флуорофора при выходе из внутреннего объема везикул, наиболее выраженным повреждающим действием на все исследованные виды липосом обладает ЦТ 4 (рис. 2). На примере данного токсина наиболее отчетливо видно, что эффективность действия ЦТ зависит от наличия и вида анионного компонента в составе липосомы. Так, если выход из нейтральных липосом при действии данного токсина составил всего ~10%, то в случае Сф-содержащих везикул – 30%. Наиболее активным ЦТ 4 оказался в отношении липосом состава ПОФХ/ФС5%, где выход красителя достигал 50%. Следует отметить, что индивидуальные различия токсинов к разным анионным липидам в составе липосом также существенны. Так, если ЦТ II практически не различает ФС- и Сф-содержащие липосомы, то в случае ЦТ 4 эффективность лизиса ПОФХ/ФС везикул почти в 2 раза выше (рис. 2б, г).

Интересно отметить, что специфического взаимодействия ЦТ 4, являющегося 100% аналогом ЦТ А3 из яда *N. atra*, с молекулами Сф не обнаружено. Более того, при повторении условий эксперимента [6] (см. «Экспериментальную часть») величина *I* после первых минут инкубации составила менее 10% (против >70% в [6]) (рис. 2в). Отметим, что в работе [6] использовали флуоресцентный краситель 6-СФ, который, имея меньший заряд молекулы, способен к спонтанному вытеканию из липосом (А.В. Феофанов, частное сообщение).

ЦТ-индуцированная пермеабиллизация ПОФХ-липосом с разным содержанием ФС. Измеряя величину *I* при действии ЦТ I, ЦТ II и ЦТ 4 на липосомы ПОФХ с разным содержанием ФС (20, 35, 50 и 70%), выявили определенную форму зависимости эффективности лизиса от концентрации анионного липида, сходную для всех трех токсинов (рис. 3). А именно, наличие максимума *I* при 20% содержания ФС в составе липосом. При этом шкала токсичности: ЦТ 4 > ЦТ II > ЦТ I сохраняется для всех видов липосом при данном соотношении липид/белок (L/P = 100). Эффективность действия ЦТ 4 и особенно ЦТ II резко возрастает в случае липосом ПОФХ/ФС20%, достигая более 90 и 70% соответственно. При меньшем (5%) или большем

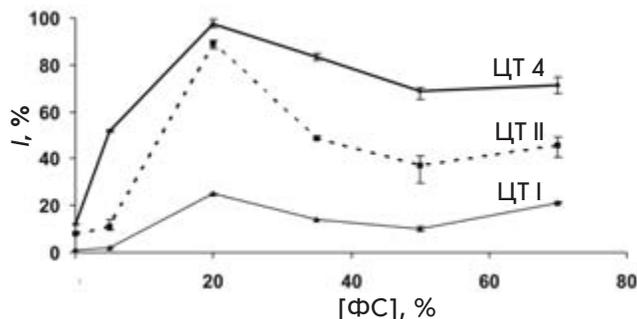


Рис. 3. Зависимость эффективности вытекания кальцеина от содержания ФС в составе мембраны ПОФХ/ФС в присутствии ЦТ 4, ЦТ I и ЦТ II. Интенсивность флуоресценции флуорофора измеряли спустя 10 мин после добавления токсина. Величины *I* рассчитывали и усредняли по 2–3 измерениям.

(35% и выше) содержанию ФС в составе липосомальной мембраны кривая активности (*I*) ЦТ II в сравнении с ЦТ 4 имеет более выраженное снижение. Отметим, что ЦТ I обладает слабой литической активностью во всем диапазоне концентраций ФС в составе липосом. Однако наблюдается слабый отклик на точку максимума (ФС20%) в виде повышения значений *I* при действии ЦТ I на липосомы ПОФХ/ФС20% (рис. 3).

Для объяснения наблюдаемых эффектов, предполагая распределение ФС в составе липосомы равномерным, мы рассчитали возможное число молекул ФС, приходящихся на молекулу токсина в липосомах (диаметром 1000 Å) разного состава. Оказалось, что число молекул ФС в случае липосом, в отношении которых ЦТ проявляют максимальную активность, совпадает с числом потенциальных сайтов связывания головки данного липида, выявленных методом молекулярного докинга. При условии полного связывания токсинов при L/P = 100 компенсация заряда липосом как раз достигается в липосомах ПОФХ/ФС20%. Таким образом, на каждую молекулу токсина приходится 10–12 молекул ФС (из которых в среднем 3.5 ФС на участке связывания токсина). Всего на молекулу ЦТ приходится 50–60 липидов, из них 16–18 располагаются непосредственно в области контакта с токсином.

Для сравнения, в липосомах ПОФХ/ФС5% компенсация по заряду достигается при очень низких концентрациях ЦТ (L/P ~300), а значит, с увеличением содержания токсина (L/P = 100) часть молекул ЦТ может находиться в не связанном с мембраной состоянии. Но даже при условии полного связывания ЦТ с поверхностью липосомы ПОФХ/ФС5% в области контакта с молекулой токсина может не оказаться ни одной молекулы ФС (в среднем 0.8 молекул ФС приходится на участок поверхности, занимаемый токсином).

Молекулярный докинг

Методом молекулярного докинга гФС в пространственные модели ЦТ 4 и ЦТ II на молекулярной поверхности обоих токсинов выявлены три сайта связывания гФС (обозначает-

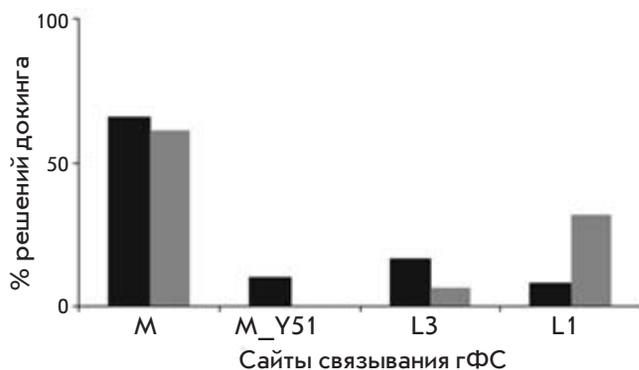


Рис. 4. Распределение решений молекулярного докинга по сайтам связывания гФС в ЦТ. Частота встречаемости решений докинга для ЦТ II (серый) и ЦТ 4 (черный), соответствующих сайтам M, M_Y51, L3 и L1, среди лучших TOP10-решений.

мые далее как «M», «L3» и «L1»), состоящие преимущественно из консервативных остатков. Ввиду наличия нескольких донорных/акцепторных групп для образования водородных связей как в лиганде, так и в рецепторе, характерной особенностью комплексов является мультивариантное расположение лиганда в сайтах (рис. 1).

Сайт M. Среди TOP10-решений докинга лидирует сайт M, наблюдающийся в 75 и 60% решений для ЦТ 4 и ЦТ II соответственно (рис. 4). Сайт M представляет собой «лизиновый» кластер (K5, K12, K18, K35), который окружает полярную поверхность («ложе» сайта), сформированную атомами основной цепи остатков L6, R36, G37, C38, а также Y22-ОН (рис. 1в, г). Более 60% решений для обоих токсинов имеют 3 и более водородных связей между ключевыми остатками сайта M (K12, Y22, R36, C38) и гФС и, как правило, несколько ионных контактов.

За счет подвижности боковых цепей остатков лизина сайт M адаптирует различные конформации гФС (рис. 1в, г). Данный сайт присутствует в десятке лучших решений докинга для большинства моделей как ЦТ 4, так и ЦТ II, включая экспериментально полученные структуры токсинов.

В отличие от ЦТ II, в наборе TOP10 ЦТ 4 присутствует группа решений (в дальнейшем «M_Y51»), где в связывании головки липида участвует гидроксильная группа остатка Y51 (рис. 1б, г). В большинстве решений M_Y51 (10 из 16 комплексов) хвостовая часть гФС ориентирована в сторону окончания петли III (рис. 1б). В остальных решениях M_Y51 глицериновая группа гФС ориентирована к петле I, при этом число водородных связей с лигандом меньше. Таким образом, положение лиганда в данной группе решений можно рассматривать в качестве промежуточного звена между положениями лиганда в сайтах M_Y51 и M. При этом Y22 оказывается ключевым остатком, с которым лиганд сохраняет взаимодействие (водородную связь) вдоль предполагаемого пути перехода от M_Y51 к сайту M (рис. 1б).

Сайты L3 и L1. Кроме основного (по числу решений) сайта M среди набора TOP10 присутствуют два сайта, L1 и L3,

локализованные на вогнутой стороне поверхности молекул ЦТ в районе петель I и III соответственно. В случае ЦТ II и ЦТ 4 данные сайты имеют разную частоту появления среди TOP10-решений докинга (рис. 4).

Сайт L3 сформирован атомами основной цепи консервативных остатков R43, Y51, C53, а также S45, в том числе боковой цепью последнего. При этом в большинстве комплексов ЦТ-гФС карбонильные группы остатков R43 и Y51, а также ОН-группа S45 фиксируют положение NH_3^+ -группы лиганда, образуя с ней водородную связь (рис. 1д, е). В ряде решений остаток глицерина гФС ориентирован в направлении окончаний петель I–III, при этом боковые цепи K44 и K50 оказываются вблизи фосфатной группы гФС (рис. 1е).

Сайт L1 ЦТ 4/ЦТ II представляет собой участок с высоким электростатическим потенциалом, включающий боковые группы остатков N4/K4, K23, R36, R58/K58, N60, которые образуют электростатически выгодные контакты с гФС. В большинстве решений как ЦТ II, так и ЦТ 4 NH_3^+ -группа гФС располагается вблизи остатка N60, образуя с карбоксильной или карбонильной группой боковой цепи водородную связь (рис. 1ж, з). Молекула гФС имеет различные ориентации относительно молекулы токсина и предполагаемого бислоя, в том числе соответствующие положению липида в составе бислоя (рис. 1ж).

ОБСУЖДЕНИЕ

Функциональная активность цитотоксинов обусловлена их взаимодействием с мембраной клетки. Однако механизм такого взаимодействия на молекулярном уровне остается неизвестным. Олигомеризация ЦТ, необходимая при формировании пор в мембране [5, 6], но отсутствующая в растворе, по-видимому, происходит в примембранной области. При этом характеристики процесса и геометрия супрамолекулярного комплекса неясны. Поэтому начальные этапы связывания токсина с мембраной крайне важны для понимания механизма цитотоксической активности ЦТ.

Полученные в настоящей работе данные по интенсивности вытекания кальцеина из липосом состава ПОФХ, ПОФХ/ФС5%, ПОФХ/Сф5% в зависимости от типа ЦТ (Р или S) согласуются с представлениями о том, что характеристики мембраносвязывающего мотива (окончания петель I–III) влияют на литическую активность ЦТ в отношении клеточных мембран. Известно, что представители Р-типа ЦТ сильнее взаимодействуют с бислоем [2, 29, 30]. Действительно, оба представителя ЦТ Р-типа, ЦТ II и ЦТ 4, обладают более выраженными литическими свойствами в отношении липосом (ПОФХ/ФС5%, ПОФХ/Сф5%) в сравнении с ЦТ I, где интенсивность вытекания красителя не превышает 5%. Предполагается, что из-за наличия полярных остатков в петле II (S28 и D29 у ЦТ I) ЦТ S-типа имеют моду взаимодействия с бислоем, характеризующуюся вовлечением меньшего числа остатков, преимущественно петли I [2, 31]. При одинаковой геометрии встраивания в бислой рассчитанная свободная энергия связывания ЦТ I выше, чем ЦТ II [30].

В ходе эксперимента также было показано, что все исследуемые токсины наиболее активны в отношении ФС-содержащих липосомальных мембран, а кривые зависимости интенсивности вытекания красителя при действии

токсина от содержания ФС в составе липосом имеют сходную колоколообразную форму с пиком интенсивности лизиса в случае липосом ПОФХ/ФС20%. Приближенная оценка числа молекул ФС в липосомах диаметром 1000 Å при соотношении липид/белок = 100 показывает, что указанный пик интенсивности наблюдается при наличии не менее трех молекул ФС на поверхности бислоя, оказывающейся в контакте с молекулой токсина в процессе встраивания. При этом различия в показателях интенсивности вытекания кальцеина между ЦТ 4 и существенно менее активным ЦТ II становятся минимальными (90 и ~70%) в сравнении с липосомами с иным содержанием ФС. Можно предположить, что оптимальное для лизиса содержание ФС в составе мембраны, обеспечивающее вовлечение всех трех сайтов токсина, оказывает значительное влияние на эффективность его взаимодействия с мембраной. Слабый отклик, наблюдаемый в случае практически неактивного ЦТ I, вероятно, связан с недостаточной глубиной встраивания этого токсина в бислой и/или альтернативной геометрией связывания с бислоем одной или двумя петлями и, соответственно, меньшей доступностью сайтов связывания для ФС.

Существенное снижение эффективности лизиса липосом ПОФХ/ФС5% при действии ЦТ указывает на то, что связывание сильно основного токсина с анионной мембраной, очевидно, включает стадию неспецифического электростатического притяжения. В результате из-за малой плотности заряда на мембране, а также отсутствия достаточного числа молекул потенциальных лигандов – ФС (меньше одного на участке контакта токсина с мембраной), связывание ЦТ с мембраной не приводит к эффективному встраиванию в бислой.

Уменьшение активности ЦТ 4 и ЦТ II в отношении липосом с содержанием ФС 35% и выше, также наблюдаемое для обоих токсинов, видимо, связано с изменением свойств бислоя, в частности – повышением плотности его упаковки в зоне интерфейса. Например, более вероятным становится процесс формирования мини-кластеров из молекул ФС. По данным расчетов молекулярной динамики бислоев с содержанием ФС 20 и 50%, в последнем случае число водородных связей в зоне интерфейса между полярными головками ФС в 2 раза выше (данные не опубликованы).

Приближенная оценка числа молекул ФС, взаимодействующих с ЦТ в липосомах ПОФХ/ФС20%, совпадает с числом ФС-связывающих сайтов на токсине, предсказанных методом молекулярного докинга. Отметим также, что встраивание исследуемых токсинов в липидный бислой гидрофобными окончаниями петель I–III подтверждается данными ЯМР-спектроскопии по взаимодействию с мицеллами ЦТ II [4], ЦТ АЗ (*N. atra*) [6].

Лидирующий по числу решений докинга сайт М (остатки К5, К12, К18, Y22, R36, С38) совпадает с сульфатидсвязывающим карманом, расположенным на «выпуклой» стороне молекулы токсина [17]. Действительно, по данным химической модификации остатков лизина и тирозина, ключевые сайты сайта, такие, как Y22, К12, существенно влияют на функциональную активность ЦТ [32, 33]. По числу межмолекулярных водородных связей и ионных контактов, наблюдаемых в решениях докинга, сайт М имеет наилучшие характеристики для образования стабильного комплекса

с лигандом. Возможность связывания с данным сайтом различных анионных компонент в составе мембраны подтверждается наличием кристаллической структуры комплекса ЦТ АЗ с сульфатидом [17]. В то же время суперпозиция моделей ЦТ, используемых в молекулярном докинге, в соответствии с модой встраивания их в бислой, указывает на разную степень доступности сайтов для головки липида ФС. В частности, остатки сайта М непосредственно не взаимодействуют с бислоем. Для попадания в сайт М молекуле липида необходимо преодолеть энергетический барьер, связанный с попаданием ацильной части липида в полярную зону интерфейса.

Интересно отметить, что в моделях семейства М_Y51, полученных с помощью докинга для ЦТ 4, сайт посадки липида предполагает образование водородной связи NH₃⁺-группой липида с ОН-группами обоих остатков тирозина, Y22 и Y51. При этом фосфатная группа оказывается вблизи поверхности мембраны. Таким образом, можно предположить, что попадание в сайт М_Y51, в отличие от сайта М, происходит быстрее. А наличие решений в М_Y51, отличающихся разной степенью вовлеченности ключевых остатков сайта М и ориентацией остатка глицерина молекулы липида, может указывать на возможный путь миграции головки липида от сайта М_Y51 к сайту М.

Прямых экспериментальных доказательств существования выявленных методом докинга сайтов L3 и L1 нет. В то же время сайт L3, находящийся в районе петли III, имеет сходный с сайтом М принцип устройства: атомы основной цепи остатков данного сайта (P43, Y51, С53), принадлежащих к стабильным элементам структуры, образуют водородные связи с полярной головкой липида, которая дополнительно электростатически удерживается заряженными группами остатков лизина (K44, K50). Кроме того, недавно консенсусная последовательность L/PKSSLL, выведенная на основе выравнивания пептидных фрагментов (имеющих сходство к антителам, нейтрализующим действие яда *N. atra*), выявленных методом фагового дисплея, предложена в качестве эпитопа, вовлеченного в цитотоксическую активность ЦТ АЗ из яда *N. atra* [34]. Данный эпитоп соответствует фрагменту последовательности петли III и включает остатки сайта L3 (P43–S45). Учитывая моду связывания ЦТ с мембраной, сайт L3 наименее доступен для ФС в составе бислоя. Можно предположить, что на более поздних этапах встраивания, когда ЦТ погружается глубже и сайт становится более доступным, связывание дополнительного липида увеличивает эффективность взаимодействия ЦТ с мембраной.

Напротив, среди решений докинга с участием сайта L1 (полярный кластер в основном заряженных остатков в основании петель I и II) присутствуют модели комплексов, где гФС находится в зоне интерфейса мембрана–вода (при условии встраивания ЦТ петлями в мембрану). Это указывает на доступность данного сайта для гФС, являющейся частью бислоя. Ранее на основании данных спектроскопии ЯМР было показано, что некоторые остатки сайта L1 участвуют в связывании дезоксиаденозинтрифосфата [16].

Интересно отметить, что всего 5 аминокислотных замен в ЦТ II превращают его в гораздо более литически активный ЦТ 4 (рис. 5). При этом общий заряд молекулы (+9) одинаков для обоих ЦТ. Неудивительно, что при высокой

Петли:		I		II		III	
Вторич. структура:		bbb	bbb	bbbbbbb	bbbbbb	bbbbbb	bbbbbb
ЦТ I	<i>N. oxiana</i>	LKCNKLVPIA	YKTCPEGK	NLCYKMFMS	DLTI	PVKRGCIDV	CPKNSLLVKYVCCNTDRCN
ЦТ II	<i>N. oxiana</i>	LKCKKLVPLF	SKTSPAGK	NLCYKMFVAA	P	HPVPVKRGCIDV	CPKSSLLVKYVCCNTDKCN
ЦТ A3	<i>N. atra</i>	LKCNKLVPLF	YKTCPEGK	NLCYKMFVAT	P	KVPVKRGCIDV	CPKSSLLVKYVCCNTDRCN
ЦТ 4	<i>N. kaouthia</i>	LKCNKLVPLF	YKTCPEGK	NLCYKMFVAT	P	KVPVKRGCIDV	CPKSSLLVKYVCCNTDRCN

Рис. 5. Выравнивание аминокислотных последовательностей исследуемых токсинов. Участки β-структуры отмечены символами «b». Аминокислотные замены, отличающие ЦТ II от ЦТ 4, отмечены подчеркиванием.

гомологии последовательности и сходстве пространственной упаковки результаты докинга также в целом совпадают, различаясь лишь частотой появления соответствующих сайтов среди решений докинга. Большинство аминокислотных замен (4 из 5) локализованы в окрестности сайта L1 (частота наблюдения которого в случае ЦТ II выше), а три из них – в наиболее важных для токсина участках – петлях I и II. Так, положительный заряд в ЦТ II (K4/N4 в ЦТ II/ЦТ 4) перемещается в петлю II (H31/K31 в ЦТ II/ЦТ 4) ЦТ 4. С одной стороны, это нарушает гидрофобный паттерн петли II, с другой – известно о способности остатков лизина «заякориваться» на интерфейсе, взаимодействуя с фосфатными группами липидов [35], что может уменьшать константу диссоциации белка. Замечено, что наличие положительного заряда в окончании петли II коррелирует с наличием гемолитической активности у ЦТ [36]. Несмотря на то что замены K4/N4 и K58/R58 в токсинах локализируются довольно далеко от поверхности мембраны (в предположении, что ЦТ встраивается окончаниями петель I–III), оба остатка являются частью сайта L1, образуя водородную связь и/или ионный контакт с сериновой головкой липида в решениях докинга. Замена S11/Y11 усиливает гидрофобные свойства петли I у ЦТ 4, так как появляются спаренные ароматические остатки F10 и Y11, которые могут являться хорошим гидрофобным «якорем». Можно предположить, что ввиду менее благоприятных условий для связывания в сайте M_Y51 (это отражается в отсутствии данного сайта среди TOP10 ЦТ II) уменьшается доступность сайта M для головки анионного липида в случае ЦТ II. Локальные конформационные отличия ЦТ II от ЦТ 4 также могут влиять на перераспределение мест связывания гФС в случае сайтов L1 и L3. Вместе с тем очевидно, что данных моделирования недостаточно для количественной оценки возможных изменений констант связывания липида в предсказанных сайтах и, следовательно, для детального объяснения различий в активности ЦТ II и ЦТ 4.

Отметим также, что проведенные нами эксперименты по вытеканию кальцеина из липосом ПОФХ/Сф5%, а также повторение условий эксперимента [6] с использованием флуорофора 6-СФ не выявили более высокого сродства ЦТ

(в частности, ЦТ 4) в отношении Сф, что противоречит данным [6]. Вместе с тем возможность связывания различных анионных компонент в составе мембраны подтверждается наличием кристаллической структуры комплекса ЦТ A3 с Сф в сайте M, а ряд экспериментов с использованием Сф-специфичных антител и ферментов показал зависимость между функциональной активностью ЦТ A3 и наличием Сф в составе мембраны [17]. Данный гликолипид в незначительных количествах присутствует во внешнем монослое мембраны клеток кардиомиоцитов крыс, чем объясняется пристальное внимание к Сф как потенциальной мишени действия цитотоксинов. Отсутствие четкой воспроизводимости результатов на модельных мембранах, помимо важности технической стороны (влияние природы красителя), указывает на необходимость осторожной экстраполяции результатов, полученных на модельных системах, на клетки. Функциональная активность токсина, вероятно, опосредована целым рядом факторов и далеко не исчерпывается показателями сродства к тому или иному компоненту мембраны.

Резюмируя, на основании данных флуоресцентных измерений активности ЦТ 4, ЦТ I и II по интенсивности вытекания красителя из анионных липосом с разным содержанием анионного липида, а также результатов молекулярного докинга гФС в ЦТ 4 и ЦТ II выдвинута гипотеза о наличии на поверхности токсина специфических липид-связывающих сайтов с разной аффинностью. Концепция двухстадийного связывания ЦТ с поверхностью мембраны (сначала – за счет электростатических, затем – гидрофобных взаимодействий), детерминантами которого являются специфические комплексы токсина с полярными головками анионного липида, позволяет качественно объяснить характер зависимости интенсивности вытекания флуоресцентного красителя от содержания ФС в составе липосомы ПОФХ. ●

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований, Программами Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и «Основы фундаментальных исследований нанотехнологий и наноматериалов».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dufton M.J., Hider R.C. // *Pharmacol. Ther.* 1988. V. 36. P. 1–40.
2. Chien K.Y., Chiang C.M., Hseu Y.C., et al. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 14473–14483.
3. Dauplais M., Neumann J.M., Pinkasfeld S., Menez A., Roumestand C. // *Eur. J. Biochem.* 1995. V. 230. P. 213–220.
4. Dubovskii P.V., Dementieva D.V., Bocharov E.V., Utkin Y.N., Arseniev A.S. // *J. Mol. Biol.* 2001. V. 305. P. 137–149.
5. Frouhar F., Huang W.N., Liu J.H., et al. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 21980–21988.
6. Tjong S.C., Wu P.L., Wang C.M., et al. // *Biochemistry.* 2007. V. 46. P. 12111–12123.
7. Kumar T., Jayaraman G., Lee C., et al. // *J. Biomol. Struct. & Dyn.* 1997. V. 15. P. 431–463.
8. Wang C.H., Wu W. // *FEBS Lett.* 2005. V. 579. P. 3169–3174.
9. Feofanov A.V., Sharonov G.V., Astapova M.V., et al. // *Biochem. J.* 2005. V. 390. P. 11–18.
10. Chiou S.H., Raynor R.L., Zheng B., Chambers T.C., Kuo J.F. // *Biochemistry.* 1993. V. 32. P. 2062–2067.
11. Raynor R.L., Zheng B., Kuo J.F. // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. P. 2753–2758.
12. Wu P.L., Lee S.C., Chuang C.C., et al. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. P. 7937–7945.
13. Lee S. C., Guan H. H., Wang C. H., et al. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 9567–9577.
14. Sue S. C., Brisson J. R., Tjong S. C., et al. // *Biochemistry.* 2001. V. 40. P. 10436–10446.
15. Tjong S.C., Chen T.S., Huang W.N., Wu W.G. // *Biochemistry.* 2007. V. 46. P. 9941–9952.
16. Jayaraman G., Krishnaswamy T., Kumar S., Yu C. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 17869–17875.
17. Wang C.H., Liu J.H., Lee S.C., Hsiao C.D., Wu W.G. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. P. 656–667.
18. Dufourcq J., Faucon J.F., Bernard E., et al. // *Toxicol.* 1982. V. 20. P. 165–174.
19. Chen K.C., Kao P.H., Lin S.R., Chang L.S. // *Toxicol.* 2007. V. 50. P. 816–824.
20. Osorio e Castro V.R., Vernon L.P. // *Toxicol.* 1989. V. 27. P. 511–517.
21. Osorio e Castro V.R., Rogers A., Vernon L.P. // *J. Nat. Toxins.* 2001. V. 10. P. 255–268.
22. Феофанов А.В., Шаронов Г.В., Дубинный М.А. и др. // *Биохимия.* 2004. Т. 69. № 10. С. 1410–1421.
23. Кухтина В.В., Вайзе К., Осипов А.В. и др. // *Биоорган. химия.* 2000. Т. 26. С. 803–807.
24. Jones G., Willett P., Glen R.C., et al. // *J. Mol. Biol.* 1997. V. 267. P. 727–748.
25. Dementieva D.V., Bocharov E.V., Arseniev A.S. // *Eur. J. Biochem.* 1999. V. 263. P. 152–162.
26. Jones G., Willett P., Glen R.C. // *J. Mol. Biol.* 1995. V. 245. P. 43–53.
27. Pyrkov T.V., Chugunov A.O., Krylov N.A., et al. // *Bioinformatics.* 2009. V. 25. P. 1201–1212.
28. Lindahl E., Hess B., van der Spoel D. // *J. Mol. Model.* 2001. V. 7. P. 306–317.
29. Dubovskii P.V., Lesovoy D.M., Dubinnyi M.A., et al. // *Eur. J. Biochem.* 2003. V. 270. P. 2038–2046.
30. Dubovskii P.V., Lesovoy D.M., Dubinnyi M.A., et al. // *Biochem. J.* 2005. V. 387. P. 807–815.
31. Efremov R.G., Volynsky P.E., Nolde D.E., et al. // *Biophys. J.* 2002. V. 83. P. 144–153.
32. Gatineau E., Toma F., Montenay-Garestier T., et al. // *Biochemistry.* 1987. V. 26. P. 8046–8055.
33. Gatineau E., Takechi M., Bouet F., et al. // *Biochemistry.* 1990. V. 29. P. 6480–6489.
34. Wang P.C., Loh K.S., Lin S.T., et al. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 2009. V. 387. P. 617–622.
35. Désormeaux A., Laroche G., Bougis P.E., Pézolet M. // *Biochemistry.* 1992. V. 31. P. 12173–12182.
36. Hider R.C., Khader F. // *Toxicol.* 1982. V. 20. P. 175–179.

УДК 576.52;577.352

Применение метода двумерного электрофореза для изучения состава рецепторного комплекса, образуемого на рецепторе CD95/Fas

Д. Риесс, И. Н. Лаврик*

Немецкий научный центр раковых исследований, 69120, Гейдельберг, Германия

*E-mail: i.lavrik@dkfz-heidelberg.de

Поступила в редакцию 25.05.2010 г.

РЕФЕРАТ Активация рецептора CD95 (APO-1/Fas) приводит к инициации апоптоза в клетках эукариот. Индукция апоптоза начинается с образования белкового комплекса на рецепторе CD95 (APO-1/Fas), который получил название DISC (death-inducing signaling complex, сигнальный комплекс, индуцирующий гибель клеток). В представленной работе для анализа состава рецепторного комплекса DISC применили методы протеомики. Предположили, что состав комплекса DISC играет ключевую роль в инициации апоптоза. С помощью метода двумерного электрофореза проанализировали комплексы DISC в клетках двух типов, различающихся скоростью индукции апоптоза. Показано, что клетки обоих типов содержат такие основные компоненты комплекса DISC, как рецептор CD95, адаптерная молекула FADD и прокаспаза-8. Также с помощью двумерного электрофореза удалось выявить различия в составе рецепторного комплекса CD95, выделенного из клеток двух типов. Таким образом, методами протеомики показано, что белковый состав комплекса DISC не одинаков в клетках двух типов, что может определять различия в скорости инициации апоптоза.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА апоптоз, рецептор CD95, двумерный электрофорез, DISC.

ВВЕДЕНИЕ

Способность запускать самоликвидацию, или апоптоз, является неотъемлемым свойством клеток высших эукариот [1]. В клетках млекопитающих существует несколько программ инициации клеточной гибели в ответ на повреждение ДНК, при отсутствии факторов роста, а также в ответ на активный сигнал смерти, передаваемый секретлируемыми или мембраносвязанными цитокинами через так называемые рецепторы смерти [1, 2].

Семейство рецепторов смерти состоит из восьми белков: TNF-R1, CD95 (APO-1/Fas), DR3, TRAIL-R1, TRAIL-R2, DR6, EDA-R и NGF-R [2]. Считается, что для передачи сигнала эти рецепторы должны образовывать олигомерные структуры, предположительно тримеры [1–3]. Цитоплазматическая часть рецепторов смерти содержит так называемые домены смерти, которые характеризуются способностью к гомотипической олигомеризации. Адаптерные молекулы, содержащие такой домен, и вовлекаются в рецепторный комплекс.

Наиболее полно изучен механизм передачи сигнала клеточной гибели через CD95/APO-1/Fas [1, 3]. Сборка активного инициаторного комплекса, называемого DISC, происходит за секунды после связывания лиганда CD95 с рецептором CD95 [3–5]. В качестве адаптера рецептор использует белок FADD, содержащий домен смерти. Второй функциональный домен этой молекулы – DED (death

effector domain) – за счет гомотипических белок-белковых взаимодействий рекрутирует в рецепторный комплекс прокаспазу-8, которая затем подвергается аутопротеолитическому расщеплению с образованием активной формы каспазы-8 (рис. 1). На следующих этапах активируются каспазы-3 и -7, а затем и субстраты апоптоза [2] (рис. 1). Характерная особенность механизма передачи сигнала смерти через CD95 состоит в существовании двух типов сигнальных путей, которые встречаются в клетках двух типов [4] (рис. 1). В клетках первого типа повышено количество комплекса CD95 DISC и соответственно активной каспазы-8, которая затем расщепляет каспазы-3 и -7 [4]. В клетках второго типа комплекс CD95 DISC образуется менее эффективно, и они содержат гораздо меньше каспазы-8, чем клетки первого типа. Поэтому для эффективной индукции апоптоза клетки второго типа нуждаются в амплификации сигнала, что достигается с помощью следующего механизма: активированная каспаза-8 расщепляет молекулу Bid, и образовавшийся фрагмент tBid транслоцируется в митохондрии, что приводит к выходу цитохрома c в цитоплазму с последующим формированием комплекса апоптосомы. В апоптосоме происходит активация каспазы-9, которая в свою очередь расщепляет (активирует) каспазы-3 и -7 (рис. 1). К клеткам первого типа относятся клеточные линии В-лимфоцитов SKW6.4, Raji, BJAB; клеточные линии Т-лимфоцитов Hut78, а также перифериче-

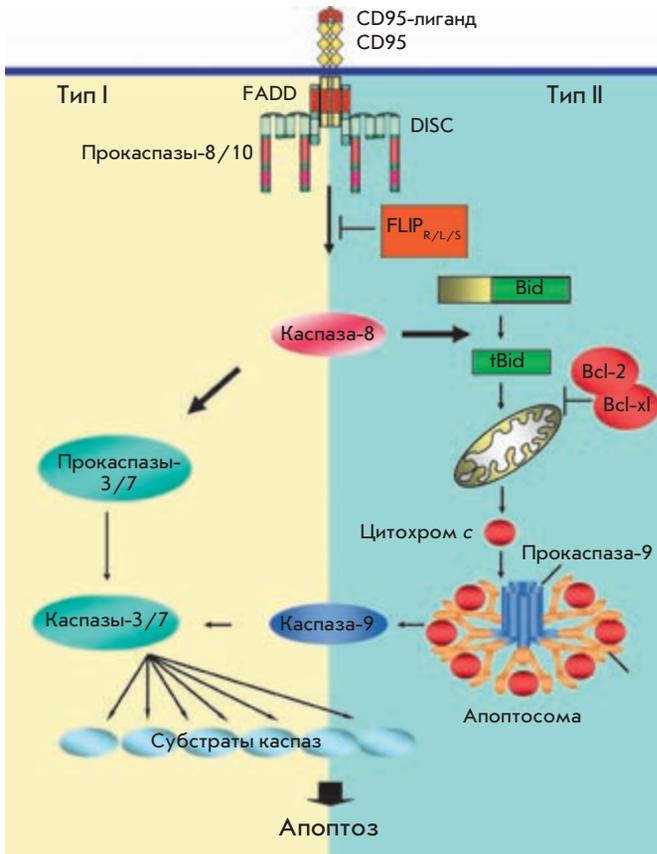


Рис. 1. Два типа передачи сигнала через рецептор CD95. Под действием лиганда на мембране происходит сборка комплекса CD95 DISC. Связывание молекулы FADD обусловлено взаимодействием доменов смерти DD (death domain). За счет взаимодействий DED (death effector domain)-доменов в комплекс поступают прокаспазы-8/10 и с-FLIP. При связывании прокаспазы-8 в комплекс CD95 DISC происходит образование активной каспазы-8. Затем в клетках первого типа, которые характеризуются повышенным образованием комплекса CD95 DISC и соответственно активной каспазы-8, апоптоз зависит от активации каспаз-3 и -7. В клетках второго типа образуется гораздо меньшее количество комплекса CD95 DISC, и для эффективной индукции апоптоза необходима амплификация сигнала, включающая расщепление Bid с помощью каспазы-8, транслокацию tBid в митохондрии, выход цитохрома с из митохондрий, образование апоптосомы и последующую активацию каспаз.

ские Т-клетки. К клеткам второго типа относятся клеточные линии Т-лимфоцитов СЕМ и Jurkat [4].

Природа различий между клетками первого и второго типа пока не установлена. Предполагается, что белковый состав комплекса CD95 DISC в клетках разного типа не одинаков. Вероятно, в клетках второго типа в состав комплекса CD95 DISC входят белки, ингибирующие активацию прокаспазы и инициацию апоптоза. Проверка этой гипотезы, а именно сравнительный анализ белкового состава комплекса CD95 DISC в клетках двух типов с помощью методов протеомики, и стала задачей нашей работы.

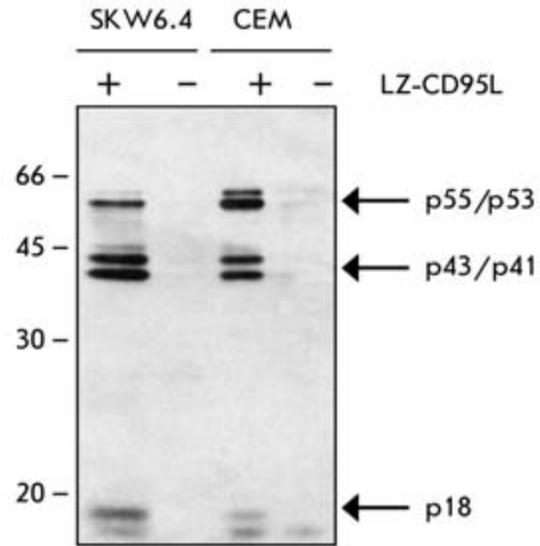


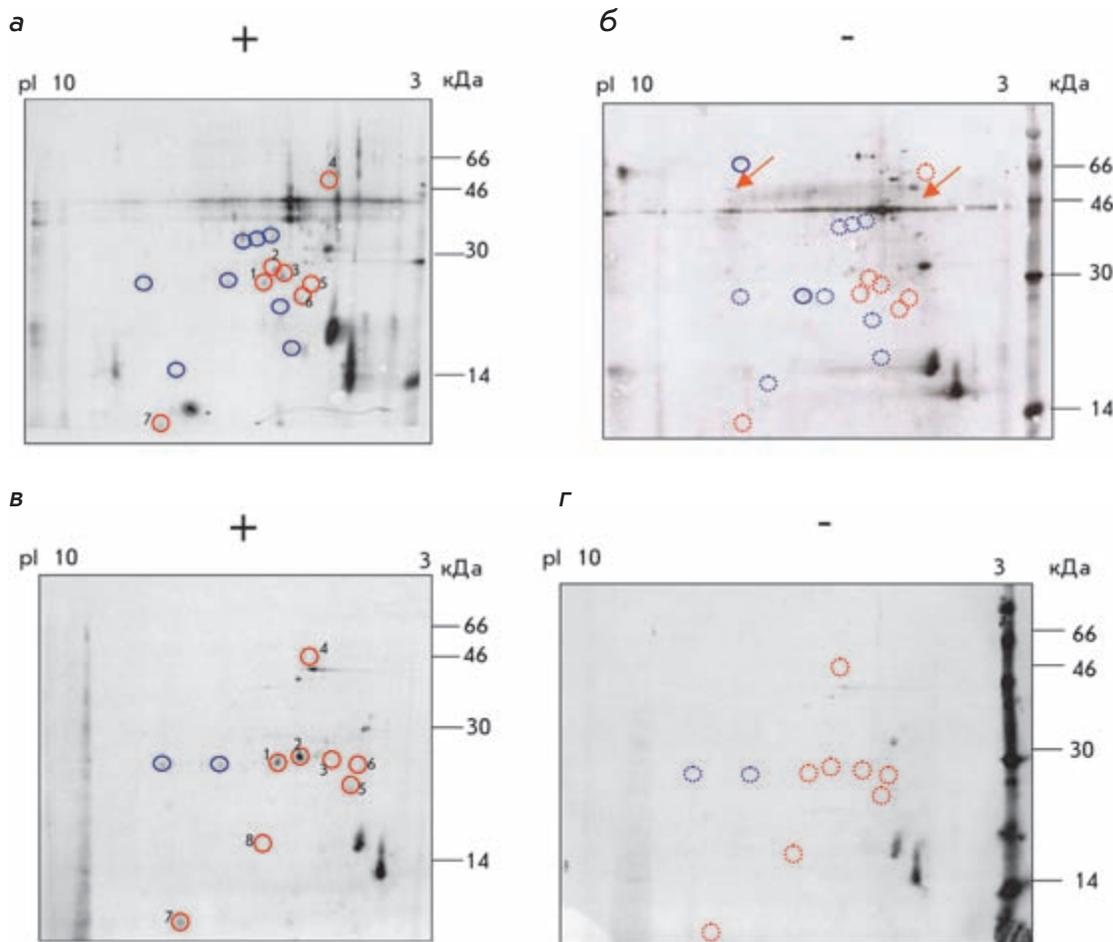
Рис. 2. Контроль образования CD95 DISC с помощью вестерн-блоттинга. Иммунопреципитаты CD95 (1/10 от количества образца, нанесенного на двумерный гель) анализировали с помощью одномерного электрофореза и вестерн-блоттинга с моноклональными антителами С15 против каспазы-8. Положение прокаспазы-8 (p55/p53) и продуктов ее расщепления p43/p41, p18 и p10 указано стрелками.

В представленной работе методом двумерного электрофореза проанализирован состав комплекса CD95 DISC. Этот метод основан на электрофоретическом разделении белков в двух направлениях – в соответствии с величинами изоэлектрических точек (pI) в первом и в соответствии с молекулярной массой (M_r) во втором [6]. Этот подход является важнейшей частью современной стратегии протеомных исследований. Вместе с тем существуют с различными модификации двумерного электрофореза, что позволяет анализировать белковые комплексы различной сложности. Мы использовали метод с иммобилизованными градиентами pH (IPG) как подход, обладающий высокой воспроизводимостью [7]. Проанализирован состав рецепторного комплекса CD95 в интервале pI от 3 до 10, а также подобраны условия проведения двумерного электрофореза в области pI 6–11 с последующим анализом белков, ассоциированных с рецептором CD95. Наш анализ позволил найти различия в белковом составе комплекса CD95 DISC, выделенного из клеток двух типов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы и биопрепараты

В работе использовали следующие реактивы и материалы: 1,4-дитио-D,L-треитол (DTT), N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (TEMED), мочевины, додецилсульфат натрия (SDS), акриламид, N,N'-метиленабисакриламид, белок-A-сефарозу фирмы «Serva»;



- Охарактеризованные белки DISC
- 1, 2 – FADD, CAP1 и CAP2
- 4 – Прокаспаза-8 (CAP4 = p55)
- 3, 5, 6 – Продукты расщепления прокаспазы-8 (CAP3, CAP5 = p26 и CAP6 = p24)
- 7, 8 – Каспаза-8 (p10, p18)
- Неохарактеризованные белки DISC

Рис. 3. Анализ CD95 DISC в клетках первого (SKW6.4) и второго (CEM) типа. К 5×10^7 клеток SKW6.4 добавили LZ-CD95L (а) или оставили без стимуляции (б). К 7×10^7 клеток CEM добавили LZ-CD95L (в) или оставили без стимуляции (г). Иммунопреципитаты CD95 анализировали с помощью двумерного электрофореза в области pI от 3 до 10. Время экспозиции радиоавтограмм – 4 недели. Представлен один из трех экспериментов. Положение CD95 отмечено стрелками. Положения основных белков комплекса CD95 указано номерами. Дифференциальные пятна показаны сплошной линией, отсутствие пятна – пунктиром.

персульфат аммония, хлорид аммония, бромфеноловый синий – фирмы «Merck».

В качестве радиоактивной метки применяли [^{35}S]Met и [^{35}S]Cys фирмы «Amersham».

В работе использовали линии В- и Т-лимфоцитов, SKW6.4 и CEM, соответственно, а также среды для культивирования клеток RPMI фирмы «Gibco». LZ-CD95L был приготовлен как описано ранее [8]. Моноклональные антитела к каспазе-8 C15 и C5 [9]; а также анти-АРО-1 [10] приготовлены в лаборатории согласно ранее описанному методу. Использовали поликлональные антитела к рецептору CD95 (C20) фирмы «Santa Cruz».

Мечение клеток [^{35}S]

Для радиоактивного мечения 5×10^7 клеток SKW6.4 или 7×10^7 клеток CEM переносили в среду RPMI без метионина и цистеина. После инкубации в течение 1 ч при тем-

пературе 37°C к клеткам добавляли [^{35}S]Met и [^{35}S]Cys, а затем культуры клеток растили в течение 24 ч до проведения эксперимента.

Иммунопреципитация рецептора CD95

К 5×10^7 клеток SKW6.4 или 7×10^7 клеток CEM добавляли лиганд LZ-CD95L (концентрация 10 мкг/мл), инкубировали в течение 10 мин при температуре 37°C . Получение клеточных лизатов, иммунопреципитацию комплекса и вестерн-блоттинг проводили как описано в [11].

Двумерный электрофорез

Для изоэлектрофокусирования образцов в первом направлении применяли готовые стрипы с нанесенными амфолинтами длиной 18 см, с pI от 6 до 11 («Amersham»).

Для изоэлектрофокусирования клеточных лизатов к 10 мкл лизатов добавляли 340 мкл буфера А (9 М мочеви-

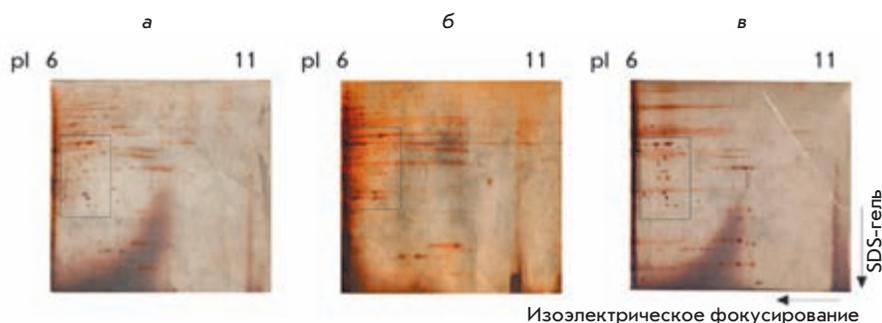


Рис. 4. Оптимизация условий изоэлектрофокусирования. Проведено изоэлектрофокусирование клеточных лизатов, полученных из 10^7 клеток SKW6.4. Затем образцы наносили на 12% гель и проводили электрофорез по Лэммли. Белки окрашивали серебром. Изоэлектрофокусирование проводили в буфере А (а, в) и буфере Б (б). Был применен следующий протокол для изоэлектрофокусирования: (а, б) 12 ч – дегидратация, 1 ч – 500 В, 1 ч – 1000 В, 1 ч – 3000 В, 8000 В до достижения 60000 В/ч. (в) 12 ч – дегидратация, 1 ч – 100 В, 1 ч – 150 В, 1 ч – 300 В, 1 ч – 400 В, 1 ч – 500 В, 1 ч – 1000 В, 1 ч – 3000 В, 8000 В до достижения 180000 В/ч.

ны, 2% CHAPS, 18 мМ DTT, 0.001% бромфенолового синего, 0.5% IPG-буфера фирмы «Amersham») или буфера Б (9 М мочевины, 2% NP-40, 18 мМ DTT, 0.001% бромфенолового синего, 0.5% IPG-буфера фирмы «Amersham»).

Для изоэлектрофокусирования иммунопреципитатов белки после иммунопреципитации элюировали с белок-А-сефарозы в течение 30 мин при комнатной температуре буфером А.

После изоэлектрофокусирования стрипы инкубировали в течение 20 мин в буфере: 50 мМ Трис-НСl, рН 8.8, 6 М мочевины, 30% глицерина, 65 мМ DTT, 0.001% бромфенолового синего. Затем повторно инкубировали в том же буфере в присутствии 2.5% йодацетамида. После этого стрипы фиксировали с помощью 0.5% агарозы на 12% SDS-полиакриламидном геле и проводили электрофорез во втором направлении.

После электрофореза гели анализировали с помощью радиоавтографии или вестерн-блоттинга. В некоторых случаях гели окрашивали серебром, используя набор фирмы «Invitrogen».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ комплекса CD95 DISC с помощью двумерного электрофореза в области рI от 3 до 10

Для проведения протеомных исследований в качестве клеток первого типа мы выбрали линию В-лимфоцитов SKW6.4, а в качестве клеток второго типа – линию Т-лимфоцитов СЕМ. Обе клеточные линии подробно охарактеризованы ранее и представляют классические примеры клеток первого и второго типа [4].

Для анализа CD95 DISC клетки SKW6.4 и СЕМ выращивали в среде, содержащей $[^{35}\text{S}]\text{Met}$ и $[^{35}\text{S}]\text{Cys}$, в течение суток. Затем для инициации апоптоза культуры клеток обрабатывали лигандом – LZ-CD95L, который специфически связывается с рецептором CD95 и инициирует образование рецепторного комплекса. После этого проводили иммунопреципитацию комплекса CD95 DISC с помощью моноклональных антител анти-АПО-1. Моноклональные антитела анти-АПО-1 распознают внеклеточный домен рецептора CD95 и применяются для иммунопреципитации рецептора или комплекса CD95 DISC [10–12]. Имму-

нопреципитаты анализировали с помощью двумерного электрофореза.

Эффективность иммунопреципитации контролировали, проводя одномерный электрофорез с использованием одной десятой части образца, анализируемого методом двумерного электрофореза, с последующим вестерн-блоттингом со специфическими моноклональными антителами против каспазы-8 (рис. 2). Этот анализ выявил присутствие в CD95 DISC как прокаспазы-8, так и продуктов ее протеолитического расщепления р43/р41, что свидетельствует о специфичности использованного метода.

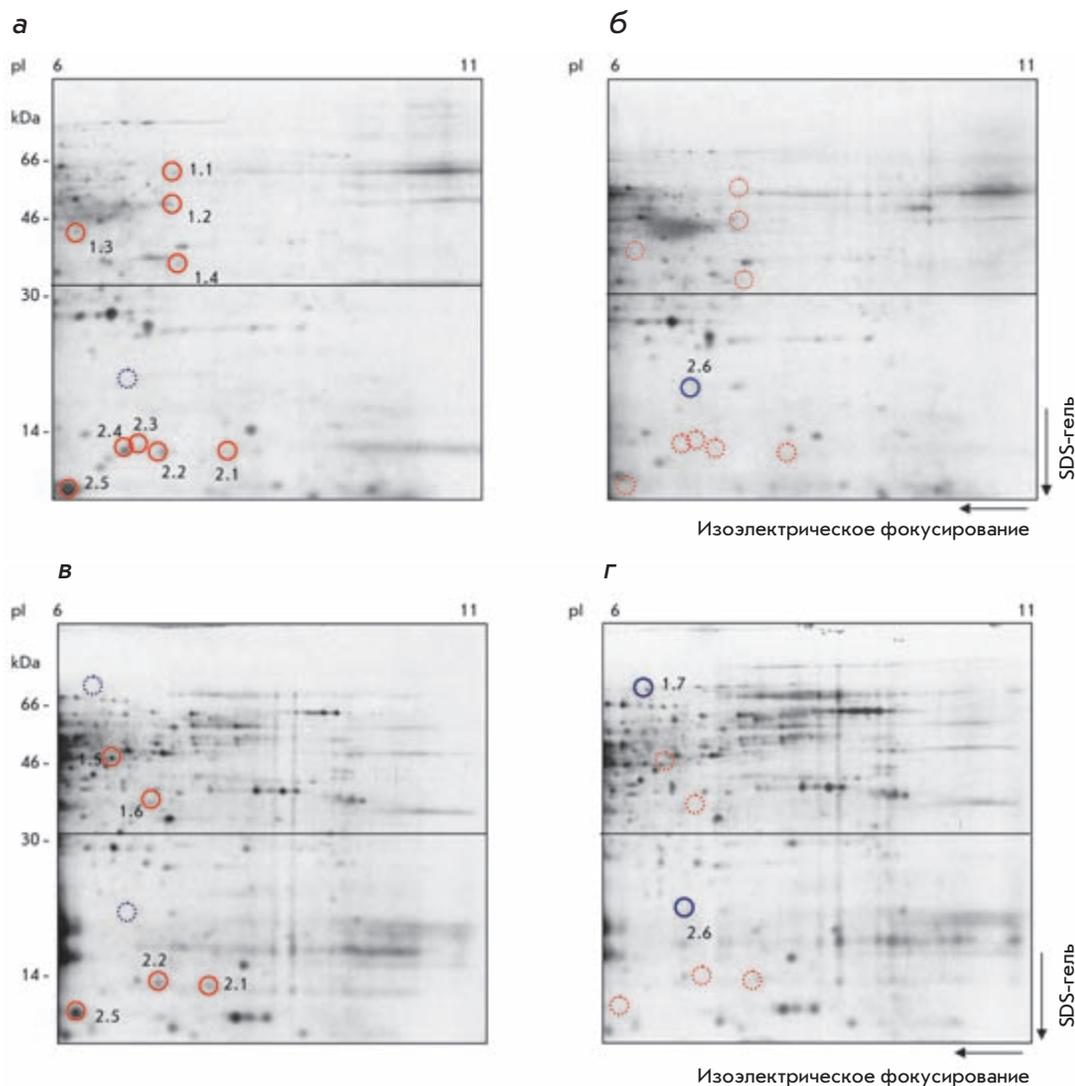
Состав комплекса CD95 DISC после иммунопреципитации проанализировали с помощью двумерного электрофореза в области рI от 3 до 10 (рис. 3). На радиоавтограммах комплекса CD95 DISC из клеток как первого, так и второго типа выявлены пятна, соответствующие по рI и молекулярной массе основным белкам комплекса CD95 DISC, охарактеризованным ранее [5, 13]. На двумерных гелях обнаружены белки CD95, FADD в двух формах – CAP1 и CAP2 (нефосфорилированной и фосфорилированной), прокаспазы-8 (CAP4) и продукты ее расщепления – CAP3, р26/р24, р18 и р10. В клетках как первого, так и второго типа выявлены новые, неохарактеризованные компоненты комплекса CD95 DISC (рис. 3). Интересно, что молекулярные массы и рI новых белков CD95 DISC были разными в клетках разного типа, что указывает на различия в составе комплекса CD95 DISC.

Анализ комплекса CD95 DISC с помощью двумерного электрофореза в области рI от 6 до 11

Поскольку разрешение метода в области выше рI 6 довольно низкое, нам удалось установить только часть белков, возможно, ассоциированных с CD95. Соответственно огромный интерес представляли белки комплекса CD95 DISC в области рI от 6 до 11.

Известно, что изоэлектрофокусирование в области рI 6–11 осложнено электроосмосом воды и миграцией DTT в сторону анода [14]. Все это значительно ухудшает качество “картины” двумерного электрофореза. Поэтому сначала мы попытались подобрать оптимальные условия изоэлектрофокусирования. С этой целью приготовили лизаты клеток SKW6.4 и провели изоэлектрофокусирование, ис-

Рис. 5. Анализ CD95 DISC в клетках первого (SKW6.4) и второго (СЕМ) типа. К 5×10^7 клеток SKW6.4 добавили LZ-CD95L (а) или оставили без стимуляции (б). К 7×10^7 клеток СЕМ добавили LZ-CD95L (в) или оставили без стимуляции (г). Иммунопреципитаты CD95 анализировали с помощью двумерного электрофореза в области pI от 6 до 11. Время экспозиции радиоавтограмм – 4 недели. Представлен один из трех экспериментов. Дифференциальные пятна показаны сплошной линией, отсутствие пятна – пунктиром.



пользуя различные протоколы и детергенты (CHAPS и NP-40) в буфере для первого направления (рис. 4). В качестве критерия качества результатов двумерного электрофореза мы рассматривали количество полученных пятен и их разрешение.

Разрешение было существенно лучше при использовании детергента CHAPS (рис. 4а) по сравнению с детергентом NP-40 (рис. 4б). Протокол изоэлектрофокусирования, использованный в наших экспериментах (рис. 4а,б), включал всего четыре режима напряжения: 500, 1000, 3000 и 8000 В. Для того чтобы получить еще более высокое разрешение двумерного электрофореза мы попытались использовать восемь режимов напряжения (от 100 до 8000 В) и более продолжительное время изоэлектрофокусирования (рис. 4в). По-видимому, эти условия способствовали более эффективному вхождению белков в гель, поскольку разрешение при этом значительно улучшилось (рис. 4в). Таким образом, в дальнейшем мы использовали детергент CHAPS в буфере для первого направления и такие же условия изоэлектрофокусирования, как на рис. 4в.

Для сравнительного анализа комплекса CD95 DISC в области pI выше 6 в качестве клеток первого типа мы выбрали клеточную линию В-лимфоцитов SKW6.4, а в качестве клеток второго типа – линию Т-лимфоцитов СЕМ. Клетки SKW6.4 и СЕМ выращивали в среде, содержащей [³⁵S]Met и [³⁵S]Cys, в течение суток. Затем для образования комплекса CD95 DISC культуры клеток обрабатывали лигандом LZ-CD95L, после чего комплекс CD95 DISC иммунопреципитировали с помощью моноклональных антител анти-АРО-1, а затем анализировали методом двумерного электрофореза в оптимизированных условиях.

На радиоавтограммах обнаружен ряд белков, которые появляются в CD95 DISC клеток как первого (рис. 5а), так и второго типа (рис. 5в). Всем белкам, имеющим молекулярную массу более 30 кДа, присвоены номера от 1.1 до 1.7, а до 30 кДа – номера от 2.1 до 2.7 (рис. 5). Молекулярные массы и pI дополнительных белков CD95 DISC из клеток первого и второго типа различались, за исключением пятна 2.5, которое присутствовало в клетках обоих типов. Следовательно, белковый состав двух комплексов не одинаков.

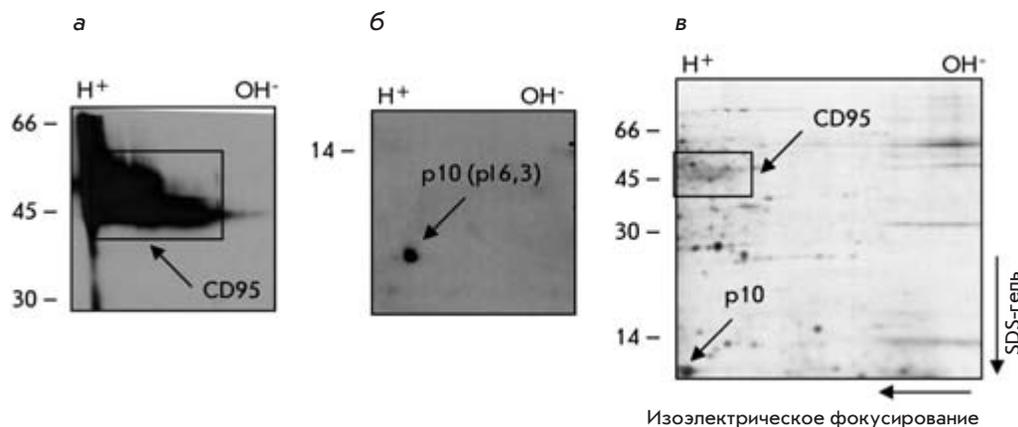


Рис. 6. Анализ двумерных электрофорезов с помощью вестерн-блоттинга. CD95 DISC, иммунопреципитированный из клеточной линии SKW6.4, анализировали методом двумерного электрофореза с помощью вестерн-блоттинга со специфическими поликлональными антителами C20 против рецептора CD95 (а) и с моноклональными антителами C15 против каспазы-8 (б). На радиоавтограмме (в) показано положение каспазы-8 и рецептора CD95.

Эффективность иммунопреципитации контролировали, как описано выше и на рис. 2. Также с помощью вестерн-блоттинга нам удалось локализовать положение уже известных компонентов комплекса на двумерных гелях: CD95 (рис. 6а,б) и активной каспазы-8 (p10) (рис. 6б). Соотнесение pI и молекулярной массы активной каспазы-8, выявляемой методом вестерн-блоттинга, с пятнами на радиоавтограммах показало, что белок 2.5 соответствует активной каспазе-8 (рис. 6в). Таким образом, мы впервые подобрали условия проведения двумерного электрофореза в области pI от 6 до 11 для анализа белков, ассоциированных с CD95.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение двумерного электрофореза позволило провести сравнительный анализ белкового состава CD95 DISC клеток первого и второго типа: SKW6.4 и СЕМ. Следует специально отметить, что различия в спектрах белков CD95 DISC из клеток первого и второго типа подтверждают гипотезу о существовании различных механизмов инициации апоптоза в этих клетках, определяющих более быструю смерть (апоптоз) клеток первого типа. В настоящий момент мы пытаемся с помощью масс-спектрометрии идентифицировать белки, обнаруженные в данной работе. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Krammer P.H. // Nature. 2000. V. 407. P. 789–795.
2. Lavrik I.N., Golks A., Krammer P.H. // J. Cell Science. 2005. V. 11. P. 265–267.
3. Peter M., Krammer P.H. // Cell Death and Diff. 2003. V. 10. P. 26–35.
4. Scaffidi C., Fulda S., Srinivasan A., et al. // EMBO J. 1998. V. 17. P. 1865–1687.
5. Kischkel F.C., Hellbardt S., Behrmann I., et al. // EMBO J. 1995. V. 14. P. 5579–5588.
6. O'Farrel P.H. // J. Biol. Chem. 1975. V. 250. P. 4007–4021.
7. Gorg A., Postel W., Gunter S. // Electrophoresis. 1998. V. 9. P. 531–546.
8. Walczak H., Miller R.E., Ariail K., et al. // Nat. Medicine. 1999. V. 5. P. 157–163.
9. Scaffidi C., Medema J.P., Krammer P.H., Peter M.E. // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 26953–26958.
10. Trauth B.C., Klas C., Peters A.M., et al. // Science. 1989. V. 245. P. 301–305.
11. Lavrik I.N., Golks A., Baumann S., Krammer P.H. // Blood. 2006. V. 108. P. 110–117.
12. Golks A., Brenner D., Fritsch C., Krammer P.H., Lavrik I.N. // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. P. 14507–14513.
13. Golks A., Brenner D., Schmitz I., et al. // Cell Death and Diff. 2005. V. 13. P. 489–498.
14. Gorg A. // Methods Mol. Biol. 1999. V. 112. P. 197–209.

УДК 576.363:578.828:577.214

Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток из фибробластов кожи плода человека

С. П. Медведев¹, А. А. Малахова¹, Е. В. Григорьева¹, А. И. Шевченко¹, Е. В. Дементьева¹, И. А. Соболев¹, И. Н. Лебедев², А. Г. Шилов¹, И. Ф. Жимулев³, С. М. Закиян^{1,4*}

¹Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. ак. Лаврентьева, 10

²НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН, 634050, Томск, ул. Набережная реки Ушайки, 10

³Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. ак. Лаврентьева, 8

⁴Научный центр клинической и экспериментальной медицины СО РАМН, 630117, Новосибирск, ул. ак. Тимакова, 2

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

Поступило в редакцию 10.04.2010 г.

РЕФЕРАТ Получение и исследование аутологичных стволовых клеток человека являются актуальной задачей современной клеточной биологии и биомедицины. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки могут быть получены из соматических клеток человека путем сверхэкспрессии набора определенных генов. В данной работе проведено репрограммирование фибробластов кожи плода человека путем трансдукции ретровирусными векторами, несущими кДНК генов *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc* мыши. В результате получены клетки, обладающие характерными для эмбриональных стволовых клеток человека экспрессией белков и паттерном транскрипции генов. Показано, что полученные индуцированные плюрипотентные стволовые клетки способны дифференцироваться *in vitro* в производные эктодермы, мезодермы и энтодермы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, репрограммирование, ретровирусные векторы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ЭСК – эмбриональные стволовые клетки, ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, ПЦР – полимеразная цепная реакция, ОТ-ПЦР – обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией.

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки человека являются уникальной моделью для исследований во многих областях биомедицины, в т.ч. для изучения молекулярных основ плюрипотентности и репрограммирования клеток – процессов, происходящих во время раннего эмбриогенеза человека [1]. Кроме того, существуют большие перспективы использования индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в токсикологических и фармакологических исследованиях, а также в регенеративной медицине [2–4].

Задачей данной работы было получение стабильных линий плюрипотентных клеток из фибробластов кожи плода человека в результате трансдукции ретровирусными векторами, экспрессирующими гены *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc* мыши.

В качестве исходной линии клеток для получения ИПСК нами были взяты фибробласты кожи плода человека (9-я неделя беременности) линии MA N1. Фибробласты трансдуцировали ретровирусами, полученными в результате котрансфекции конструкций рМХs-*Oct4*, рМХs-*Sox2*, рМХs-*Klf4* и рМХs-*c-Myc*, несущих кДНК генов *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc* мыши [5], и плазмиды, экспрессирующей гликопротеин G вируса везикулярного стоматита (VSV-G), в клетки упаковочной линии НЕК293 Phoenix, несущей

в геноме вирусные гены *Gag* и *Pol*. Для контроля трансдукции использовали ретровирус, полученный на основе конструкции рМХ-GFP (Cell Biolabs, США), кодирующей флуоресцирующий белок GFP. Трансдуцировали 1 млн фибробластов. Через 48 ч после трансдукции клетки пересаживали на слой фидера (митотически неактивные фибробласты мыши, обработанные митомицином С) в среде для культивирования ЭСК человека с добавлением 2-пропилвалериановой кислоты (VPA, концентрация 0.5 мМ). В течение второй недели после трансдукции появилось около 500 гранулярных колоний клеток, морфологически отличающихся от фибробластов. Однако данные колонии были отрицательны при окраске на щелочную фосфатазу (Alkaline Phosphatase, AP) (одного из маркеров плюрипотентных клеток). Вероятно, данные клетки соответствуют начальным стадиям репрограммирования [6]. В течение 15–30 сут после трансдукции продолжали отбор ЭСК-подобных клонов. Отбор проводили по морфологическому критерию. Схема эксперимента представлена на рис. 1. Среди 200 клонов, которые продолжали культивировать, стали появляться AP-позитивные. Всего в результате эксперимента было получено 18 стабильных ЭСК-подобных линий, четыре из которых (hiPS-A24, hiPS-A29, hiPS-21L и hiPS-30L) были подробно охарактеризованы. Клетки дан-

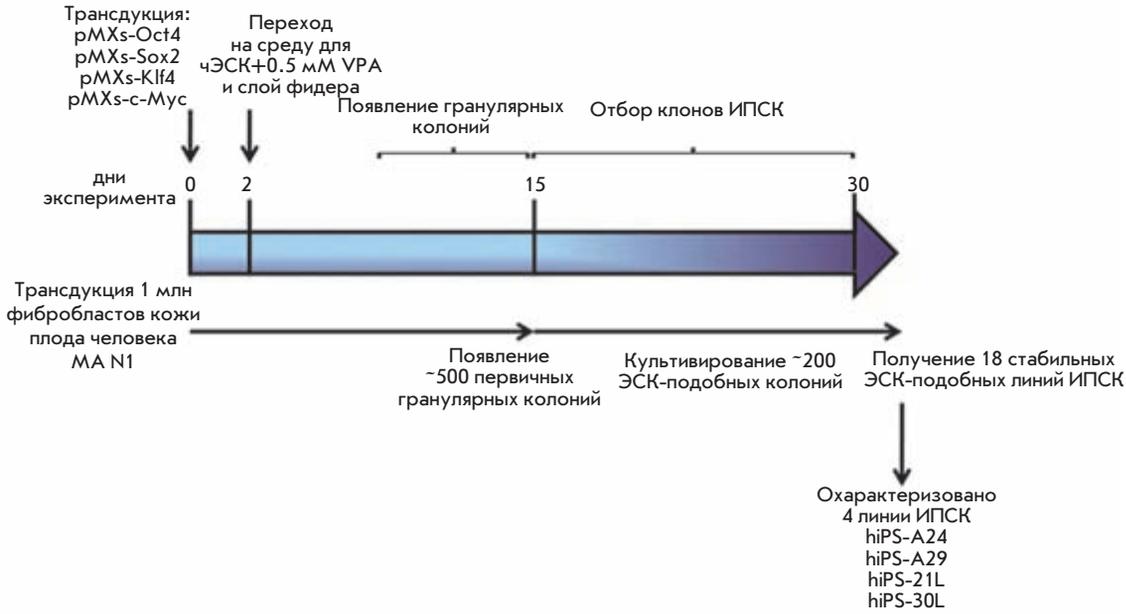


Рис. 1. Схема эксперимента по получению индуцированных плюрипотентных клеток из эмбриональных фибробластов человека.

ных клонов имеют большое ядерно-цитоплазматическое отношение, растут плотными колониями, т.е. обладают морфологическими характеристиками ЭСК человека (рис. 2А), они AP-позитивны (рис. 2Б). С помощью ПЦР было определено, что все четыре линии содержат в геноме встройки использованных ретровирусных конструкций (pMXs-Oct4, pMXs-Sox2, pMXs-Klf4 и pMXs-c-Myc). С помощью иммуноцитохимического метода было обнаружено, что в данных клетках экспрессируются маркеры плюрипотентных клеток: поверхностные антигены TRA-1-60, TRA-1-81 и SSEA-4, а также транскрипционные факторы NANOG и OCT4 (рис. 3). С помощью ОТ-ПЦР (обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией) была исследована транскрипция 25 генов, являющихся маркерами ЭСК человека (рис. 4А). Было обнаружено, что все четыре клон очень сходны по паттерну экспрессии генов с линией ЭСК человека HUES9, которая была взята в качестве позитивного контроля. В индуцированных плюрипотентных стволовых клетках, полученных из фибробластов кожи плода,

экспрессируются такие надежные маркеры плюрипотентных клеток, как гены OCT4, NANOG, SOX2, FGF4, REX1, DNMT3B, NODAL и др. (рис. 4А). Единственное различие было обнаружено по транскрипции гена GDF3. Из четырех проанализированных линий ИПСК данный ген транскрибируется только в hiPS-21L. Из 25 маркерных генов в фибробластах MA N1 наблюдается транскрипция только генов KLF4 и c-MYC (рис. 4А). Клетки ИПСК hiPS-A24, hiPS-A29, hiPS-21L и hiPS-30L при переводе в суспензионную культуру формируют эмбриоидные тельца (рис. 4Б). ОТ-ПЦР-

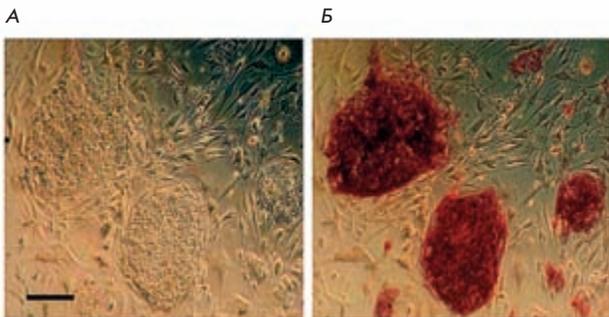


Рис. 2. А – морфология колоний ИПСК, полученных из эмбриональных фибробластов человека; Б – окраска колоний ИПСК, демонстрирующая экспрессию щелочной фосфатазы (одного из маркеров плюрипотентных клеток). Масштабная линейка – 100 мкм.

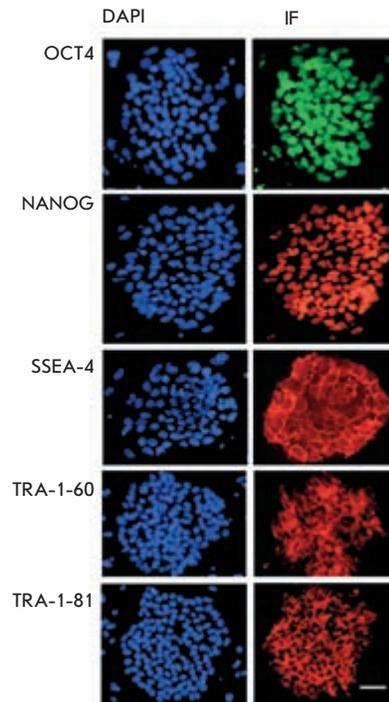


Рис. 3. Иммуноцитохимическое окрашивание (IF) колоний ИПСК антителами к белкам транскрипционных факторов OCT4 (зеленый цвет) и NANOG (красный цвет), а также поверхностным антигенам: SSEA-4, TRA-1-60 и TRA-1-81 (красный цвет). Ядра клеток окрашены DAPI (синий цвет). Масштабная линейка – 100 мкм.

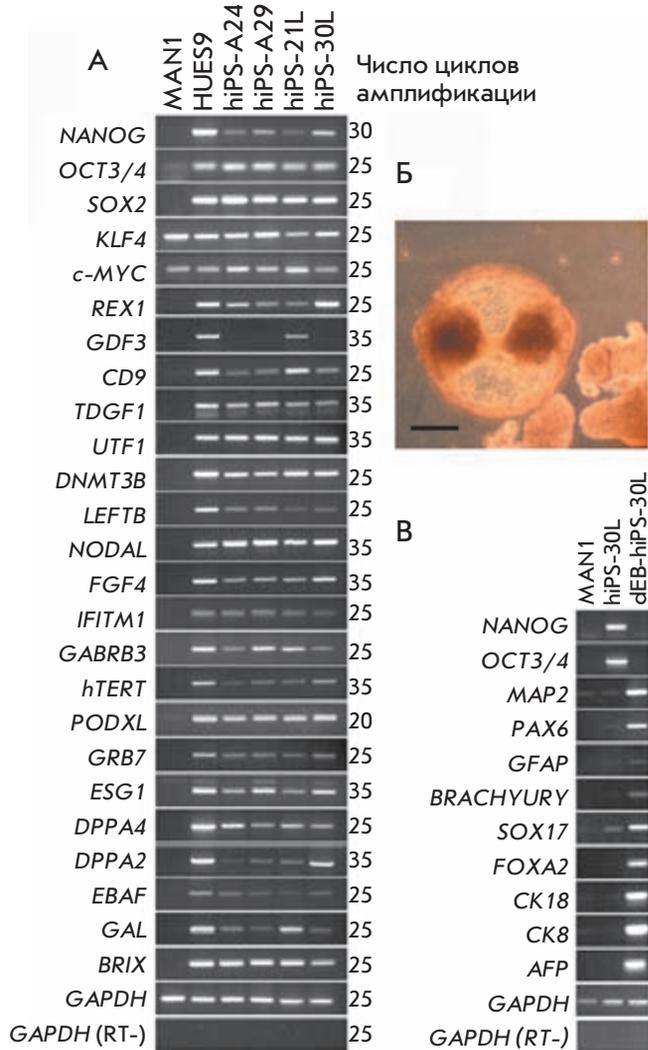


Рис. 4. А – ОТ-ПЦР-анализ транскрипции генов, являющихся маркерами эмбриональных стволовых клеток человека, в эмбриональных фибробластах (MAN1), эмбриональных стволовых клетках человека (HUES9) и четырех линиях индуцированных плюрипотентных стволовых клеток: hiPS-A24, hiPS-A29, hiPS-21L и hiPS-30L; Б – эмбрионидные тельца, сформировавшиеся при переводе клона ИПСК hiPS-30L в суспензионную культуру; масштабная линейка – 100 мкм; В – ОТ-ПЦР-анализ транскрипции генов, являющихся маркерами дифференцировки клеток в производные трех зародышевых листков (эктодермы, мезодермы и энтодермы), после *in vitro*-дифференцировки клеток клона hiPS-30L через образование эмбрионидных тел.

анализ клеток, получившихся после культивирования эмбрионидных тел, показал наличие маркеров производных всех трех зародышевых листков: эктодермы (MAP2, PAX6, GFAP), мезодермы (BRACHYURY) и энтодермы (SOX17, FOXA2, CK8, CK18, AFP) (рис. 4B). Иммуноцитохимический анализ клеток дезагрегированных эмбрионидных тел выявил наличие различных клеточных производных, экспрессирующих маркеры эктодермы (β-III-тубулин и GFAP), мезодермы (коллаген I и фибронектин) и энто-

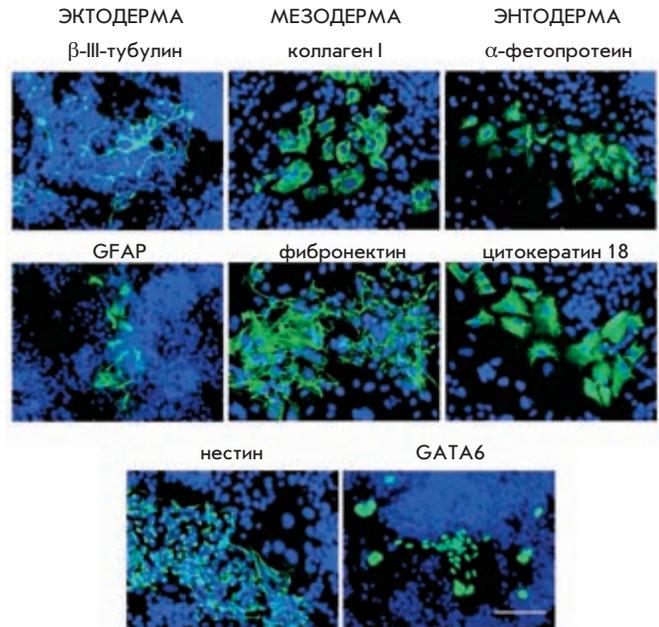


Рис. 5. Экспрессия маркеров производных трех зародышевых листков (эктодермы, мезодермы и энтодермы) при спонтанной дифференцировке в эмбрионидных тельцах ИПСК, полученных из фибробластов кожи плода человека. Масштабная линейка – 100 мкм.

дермы (α-фетопротеин и цитокератин 18) (рис. 5). Кроме вышеперечисленных выявлены клетки, экспрессирующие маркер энтодермы и мезодермы GATA6, а также белок нестин, который является маркером производных эктодермы и мезодермы (рис. 5). Таким образом, было показано, что полученные ИПСК человека обладают широким потенциалом дифференцировки *in vitro*. Каротиотипический анализ полученных линий ИПСК показал, что они имеют нормальный набор хромосом – 46, XY.

Таким образом, было показано, что экспрессия генов *Oct4*, *Sox2*, *c-Myc* и *Klf4* мыши в клетках человека способна вызывать репрограммирование и образование стабильных клонов ИПСК, по своим характеристикам аналогичных ЭСК человека. Репрограммирование фибробластов с помощью ретровирусных конструкций является воспроизводимым методом, позволяющим получать в относительно короткий срок большое количество клонов плюрипотентных клеток. ●

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yamanaka S. // Cell. 2009. V. 137. P. 13–17.
2. Park I.H., Arora N., Huo H., et al. // Cell. 2008. V. 134. P. 877–886.
3. Ebert A.D., Yu J., Rose F.F., Jr., et al. // Nature. 2009. V. 457. P. 277–280.
4. Lee G., Papapetrou E.P., Kim H., et al. // Nature. 2009. V. 461. P. 402–406.
5. Takahashi K., Yamanaka S. // Cell. 2006. V. 126. P. 663–676.
6. Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., et al. // Cell. 2007. V. 131. P. 861–872.

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, 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.
- 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 (A, T, G, C, U), аминокислотных остатков (Arg, Ile, Val и т.д.) и фосфатов (ATP, AMP и т.д.) пишутся в латинской транскрипции прямым шрифтом.
 - Нумерация азотистых оснований и аминокислотных остатков пишется без дефиса (T34, 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. Если авторов меньше 5, указываются все фамилии, если авторов 5 и больше, указываются три первых автора, например:

Bressanelli S., Tomei L., Roussel A., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. P. 13034–13039.

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.