

Письмо редакторов

Дорогие друзья!

Вашему вниманию предлагается очередной, шестой номер журнала *Acta Naturae*.

Как и прежде, мы не отходили от традиции публикации нескольких обзорных статей по перспективным направлениям наук о живом, экспериментальных статей и раздела «Форум».

Вопрос баланса врожденного и адаптивного иммунного ответа в борьбе организма с инфекциями волнует научную общественность с середины девяностых годов прошлого столетия. В последние годы стало очевидно, что компонента врожденного иммунитета зачастую недооценивалась. Раскрылось много новых обстоятельств, подтверждающих значение работ нашего великого соотечественника, Лауреата Нобелевской премии Ильи Мечникова. В этой связи хотелось бы упомянуть обзор Шеблякова с соавт., посвященный роли врожденного иммунитета, а именно Толл-подобным рецепторам при опухолевой прогрессии. Мы также считаем необходимым продолжить обсуждение на страницах журнала проблем плюрипотентности стволовых клеток (обзор Медведева и соавт.). Современная медицина в не очень отдаленной перспективе приобретет «персонифицированный» характер. Возросшие возможности быстрого секвенирования геномов, детекции отдельных генов, ответственных за экспрессию пула белков, участвующих в развитии той или иной патологии, обеспечат эффективный подбор индивидуальных терапевтических схем и индивидуальных лекарств. В скором времени можно будет прогнозировать ответ индивида на конкретное терапевтическое воздействие, что особенно важно в случае применения тяжелых для соматического состояния больных препаратов. Редакция журнала не забывает и классическую биохимию, энзимологию. Достаточно напомнить огромное значение ферментов, специфичных к пенициллину. Роль их в выработке адекватных биотехнологических схем и в фармакологических разработках трудно переоценить (обзор Тишкова и соавт.).

Статьи номера покрывают широкий спектр материалов в области физико-химической биологии, в частности физиологической роли пептидных структур (Минкевич с соавт.) до структурных особенностей наноантител (Тиллиб с соавт.). Редакция предлагает читателю статью в области молекулярной физиологии клетки (Шальгин с соавт.), в которой продемонстрирована роль белков семейства Nox

в регуляции депо-управляемых кальциевых каналов. Несколько статей посвящено инновационным подходам в области диагностики и драг-дизайна (Беккер с соавт. и Уляшова с соавт.). Редакция и в дальнейшем не будет отказываться от серьезных разработок в области инновационной «биофармы».

В разделе «Форум» читатель найдет интервью с лауреатами Государственной премии Российской Федерации в области науки и технологий за 2009 год, которое было анонсировано в предыдущем, пятом номере журнала *Acta Naturae*. Кроме того, большое внимание мы уделили целенаправленным действиям государства по укреплению науки в университетах, которые вызвали в профессиональном сообществе оживленные дискуссии. После определения вузов-лидеров – исследовательских и федеральных, которым, помимо статусов, выделяют еще и дополнительные средства, Министерство образования и науки объявило новые конкурсы для вузов – на кооперацию с бизнесом, укрепление инновационной инфраструктуры и привлечение ведущих ученых. В разделе «Форум» читатели смогут прочитать не только обзорную статью, но и комментарии представителей Минобрнауки по результатам конкурсов по кооперации бизнеса и вузов и по поддержке развития инновационной инфраструктуры (*постановления Правительства РФ № 218 и 219 соответственно*). О тонкостях оценки заявок на гранты для приглашения ведущих ученых (*постановление Правительства РФ № 220 «О мерах по привлечению ведущих ученых в российские образовательные учреждения высшего профессионального образования»*) рассказывает Сергей Иванец, директор департамента международной интеграции Минобрнауки.

Редакция работает над расширением круга авторов. Издание открыто не только для признанных лидеров биомедицинской науки. Мы приглашаем аспирантов и молодых ученых публиковать на наших страницах свои оригинальные исследования. Мы обещаем обеспечить в максимально сжатые сроки объективное рецензирование статьи ведущими специалистами. Приглашаем всех к сотрудничеству. Отзывы и пожелания редколлегии просим направлять на адрес нашей редакции actanaturae@gmail.com. ●

Успехов вам в научных исследованиях!
Редакционная коллегия

I международная научно-практическая конференция

Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине

17-19 ноября 2010

Организаторы

Федеральное медико-биологическое агентство
НИИ физико-химической медицины ФМБА России
Московский государственный университет имени
М.В. Ломоносова
ООО «Парк-медиа»

При поддержке:

Министерство образования и науки Российской Федерации
Российская академия медицинских наук
Сибирское отделение Российской академии наук

В рамках конференции состоятся:

Выступления российских и зарубежных ученых;
Выставка и многое другое
Лекции и доклады;
Семинары и свободные обсуждения;

Место проведения:

Москва, Первый учебный корпус гуманитарных наук
МГУ имени М.В. Ломоносова

ПО ВОПРОСАМ УЧАСТИЯ ОБРАЩАЙТЕСЬ:

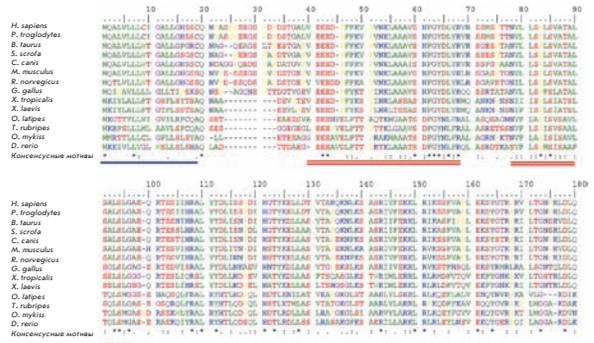
Тел.: +7 (495) 930 8850, 930 8707

E-mail: info@postgenom.ru

Н. И. Минкевич, В. М. Липкин, И. А. Костанян

PEDF – неингибиторный серпин с нейропротекторной и антиангиогенной активностями

Фактор дифференцировки из пигментного эпителия PEDF (Pigment epithelium-derived factor), гликопротеин с молекулярной массой 50 кДа принадлежит к семейству неингибиторных серпинов. PEDF регулирует большое число физиологических процессов, к нему проявляется огромный интерес исследователей как к перспективному препарату для терапии широкого спектра нейродегенеративных, офтальмологических и онкологических заболеваний. В обзоре суммированы современные данные о структурных особенностях, биохимических свойствах PEDF, его много-модальных функциях.



Сравнение аминокислотных последовательностей фактора PEDF разных биологических видов.



Д. В. Игнатов, Т. А. Скворцов, К. Б. Майоров, А. С. Апт, Т. Л. Ажикина

Адаптивные изменения профиля экспрессии генов *Mycobacterium avium* при заражении мышей, генетически чувствительных и резистентных к инфекции

Проведено исследование транскриптомов *Mycobacterium avium* (штамм 724R) при инфекции мышей различных линий – генетически чувствительных и резистентных к этим бактериям. Определен набор генов *M. avium*, транскрибирующихся в легочной ткани мышей сравниваемых линий, и выявлены дифференциально транскрибирующиеся гены.

Метаболическое состояние микобактерий в макрофагах мышей различных линий.

М. М. Уляшова, Ю. И. Халилова, М. Ю. Рубцова, М. В. Эйдельштейн, И. А. Александрова, А. М. Егоров

Олигонуклеотидный микрочип для идентификации генов карбапенемаз молекулярных классов А, В и D

Разработан метод гибридизационного анализа на ДНК-микрочипах для одновременной идентификации и типирования генов, кодирующих ферменты карбапенемазы, продуцируемые микроорганизмами – возбудителями инфекционных заболеваний. Метод характеризуется хорошей точностью и производительностью. Он может быть использован в клинических микробиологических лабораториях для идентификации и изучения эпидемиологии карбапенемаз.

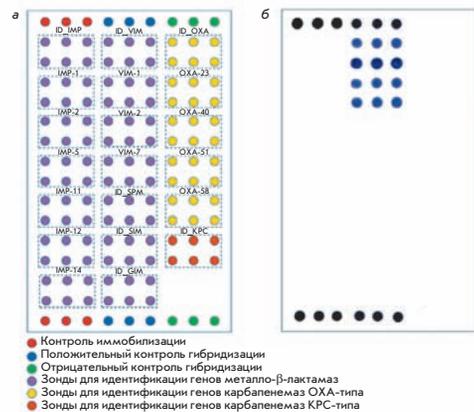


Схема расположения специфических и контрольных олигонуклеотидных зондов на поверхности ДНК-микрочипа для определения генов карбапенемаз.

Acta Naturae

ТОМ 2, № 3 (6), ИЮЛЬ-СЕНТЯБРЬ 2010

Учредители:

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

Редакционный совет:

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

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

Редакционная коллегия:

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

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

А.А. Потапов: «В нейрохирургии
используются достижения современной
биологии во всех ее аспектах» 10

Наука в вузах: приказано жить 14

Подведены итоги конкурсов
по кооперации бизнеса и вузов 18

Международная экспертиза
для супергрантов 26

ОБЗОРЫ

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

Толл-подобные рецепторы (TLR)
и их значение в опухолевой прогрессии. . . . 28

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

Молекулярные основы поддержания
самообновления и плюрипотентности
эмбриональных стволовых клеток
млекопитающих 38

СОДЕРЖАНИЕ

В. И. Тишков, С. С. Савин, А.С. Ясная
Белковая инженерия пенициллинацилаз ... 58

Н. И. Минкевич, В. М. Липкин, И. А. Костанян
PEDF – неингибиторный серпин с нейропротекторной и антиангиогенной активностями..... 74

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

И. В. Звягин, В. Ю. Дородных, И. З. Мамедов, Д. Б. Староверов, А. Г. Бочкова, Д. В. Ребриков, Ю. Б. Лебедев
Ассоциация аллельного варианта гена аминопептидазы ERAP1 с риском развития анкилозирующего спондилита ... 86

Д. В. Игнатов, Т. А. Скворцов, К. Б. Майоров, А. С. Апт, Т. Л. Ажикина
Адаптивные изменения профиля экспрессии генов *Mycobacterium avium* при заражении мышей, генетически чувствительных и резистентных к инфекции 93

С. В. Тиллиб, Т. И. Иванова, Л. А. Васильев
Фингерпринтный анализ селекции наноантител методом фагового дисплея с использованием двух вариантов фагов-помощников 100

А. В. Шалыгин, М. А. Рязанцева, Л. Н. Глушанкова, И. Б. Безпрозванный, Г. Н. Можаяева, Е. В. Казначеева
Регуляция депо-управляемых кальциевых каналов белками семейства *Noter* в клетках A431..... 109

М. М. Уляшова, Ю. И. Халилова, М. Ю. Рубцова, М. В. Эйдельштейн, И. А. Александрова, А. М. Егоров
Олигонуклеотидный микрочип для идентификации генов карбапенемаз молекулярных классов А, В и D 116

О. Б. Беккер, М. Г. Алексеева, Д. И. Осолодкин, В. А. Палюлин, С. М. Елизаров, Н. С. Зефиоров, В. Н. Даниленко

Новая тест-система для скрининга ингибиторов серин-треониновых протеинкиназ: конструктор *Escherichia coli* ARNIII/Pk25 126

Н. Н. Чеканов, Е. С. Булыгина, А. В. Белецкий, Е. Б. Прохорчук, К. Г. Скрыбин

Характеристика генома русского мужчины на основе анализа однонуклеотидных полиморфизмов и реконструкции последовательностей ДНК..... 140

Правила для авторов 146

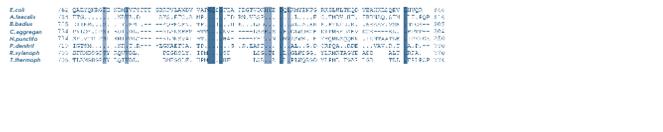
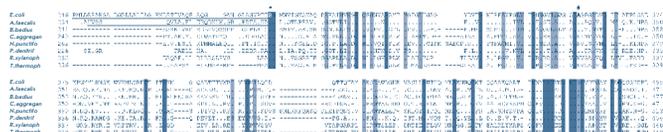


РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ

Сравнение аминокислотных последовательностей пенициллинацилаз G из различных источников.

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

(Продолжение. Начало см. в №2 (5) за 2010 г.)

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 года) 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 интервью АН лауреаты премии рассказывают о разработках, удостоенных награды и имеющих фундаментально-прикладное значение для современной медицины.

Лауреат Госпремии доктор физико-математических наук, академик РАН, директор Института проблем лазерных и информационных технологий РАН Владислав Панченко.

Владислав Яковлевич, расскажите, пожалуйста, за какую работу Вы были удостоены Государственной премии?

– В Институте проблем лазерных и информационных технологий была впервые создана система дистанционного изготовления индивидуальных имплантов и биомоделей по томографическим данным предоперационного обследования пациентов.

Эта междисциплинарная работа, в которой принимали участие институты РАН, МГУ им. М.В. Ломоносова, ведущие медицинские центры: Московский областной научно-

исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского (МОНИКИ), НИИ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко, Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена (МНИОИ им. П.А. Герцена), Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии Федерального агентства по высокотехнологичной медицинской помощи (ЦНИИСИ РАМН), Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина (РОНЦ им. Н.Н. Блохина). В Институте проблем лазерных и информационных технологий РАН (ИПЛИТ РАН) основные работы были выполнены в лабораториях, руководимых В.В. Васильцовым, А.В. Евсеевым и А.В. Ульяновым.

Лазерно-информационные технологии дистанционного биомоделирования мы начали развивать более 15 лет назад. Отрадно, что эта технология уже входит в утвержденный Минздравсоцразвития перечень высокотехно-

логических процедур в онко- и нейрохирургии.

Алгоритм технологии следующий. Делается трехмерная диагностика пациента, как правило, томографом. Современная томография позволяет диагностировать как костные фрагменты, так и мягкие ткани с разрешением порядка 1 миллиметра. Полученные томографические данные передаются по сети Интернет в центр быстрого прототипирования в г. Шатуру Московской области.

Здесь проводится компьютерная верификация полученной томографической модели, формируется рабочая программа воссоздания модели, которая передается в управляющий компьютер лазерного стереолитографа. В рабочую камеру стереолитографа заливается сложный композитный полимер (разработанный совместно с Институтом химической физики и Центром фотохимии РАН), и лазерный луч определенной длины волны, определенной мощности, с определенной частотой сканирует по-



Владислав Панченко

верхность жидкости по заданной программе. След лазерного пучка твердеет на определенную глубину. Все основные приборы в данном центре (лазерные стереолитографы, системы селективного лазерного спекания микро- и нанопорошков) разработаны и созданы в лабораториях и опытном производстве института.

Сколько времени занял подбор этих условий?

В нашем институте велись эксперименты по фотохимии с использованием различных лазеров. По результатам экспериментов формировалось техническое задание на синтез но-

вого олигомера. Были сделаны десятки итераций, прежде чем стали получаться твердые (не рассыпающиеся при легком прикосновении) биомодели, точно воспроизводящие данные томографического обследования пациента.

Над подбором условий лазерной фотополимеризации более 5 лет работали несколько лабораторий. Это очень интересная, деликатная и трудоемкая технология, по которой в автоматическом режиме слой за слоем формируется биомодель, например череп или его костный фрагмент, потерянный в результате травмы.

Сейчас в ИПЛИТ РАН исследуются возможности многофотонной лазерной полимеризации. Предварительные исследования показывают реальность создания топологически сложных структур с пространственным разрешением до 10 нм. Такое высокое разрешение потребуется для развития будущих технологий онконейрохирургии и в когнитивных исследованиях.

Лазерно-информационная технология дистанционного биомоделирования позволяет очень точно спланировать предстоящую операцию. Так, например, ее использование в спинальной

хирургии позволяет изготовить и «подогнать» имплант на биомодели, не беспокоя пациента. Обобщая накопленный опыт, можно сказать, что, используя быстрое прототипирование в создании индивидуальных биомоделей по томографическим данным, можно подготовить сценарий операций практически в любом разделе медицины.

Благодаря использованию данной технологии в среднем происходит ускорение операционного времени в 2–3 раза, примерно во столько же раз уменьшается реабилитационный период. Количество подготовленных и проведенных по данной технологии операций приближается уже к 4 тысячам, технологию используют более чем в 30 клиниках страны. Наибольшее распространение данная технология получила в нейрохирургии, где практически все делается под микроскопом. В челюстно-лицевой хирургии десятки детей спасены от уродства и врожденных болезней с использованием этого метода. Метод заинтересовал многих действующих хирургов, в том числе и онкохирургов, начинает проникать и в кардиохирургию. Впрочем, здесь я уже вторгаюсь не в свою область. Это медицина. Лучше об этом Вам побеседовать с моими коллегами академиком А.А. Потаповым и академиком В.И. Чиссовым.

Авторы этого метода – российские ученые?

– Да. Судя по имеющимся в нашем распоряжении литературным данным, наши коллективы одни из первых создали биомодели по индивидуальным томографическим данным пациента, которые нашли широкое применение в клинической практике. Это была наша концептуальная идея – сделать индивидуальные «запчасти» для человеческого организма по предварительному

томографическому обследованию, выполненному в любой точке земного шара. В принципе, можно просканировать человеческий скелет, записать результаты, а в случае необходимости – обратиться к этой информации, воспроизвести нужные фрагменты, например костные, и поставить на место перелома. Уже проводятся такие операции на животных, и они успешны.

Владислав Яковлевич, требуется ли для развития данной технологии правительственная поддержка?

– Правительственная поддержка всегда важна. Тем более в таких крупных проектах, носящих международный характер. И в первую очередь вот в чем. Подобные операции необходимо максимально стандартизировать. Когда мы говорим о технологиях современной медицины, то под технологиями мы понимаем набор определенных действий, которые могут быть повторены в случае правильного описания в другом месте другим профессионалом.

Создание технологии – это фундаментальное исследование и в какой-то мере искусство, а использование ее – это нормальная, в хорошем смысле рутинная работа. Россия часто поражает мир уникальными операциями, но повторить ее, поставить на поток, помочь всем страждущим не удается, потому что нет технологии. Это high, но не tech, а если мы говорим о медицинской высокотехнологичной массовой помощи, она должна быть именно технологичной.

Успешное создание биомоделей вдохновило Вас и Ваш коллектив на создание имплантов из биосовместимых материалов?

– В какой-то степени да, это уже следующий этап, связанный с тканевой инженерией. Совместно с Институтом трансплантологии и искусственных

органов мы занимаемся поиском новых биосовместимых материалов с использованием технологии лазерной стереолитографии и очистки материалов с использованием сверхкритических жидкостей. Это позволит создать как импланты сложной конфигурации, так и скаффолды – сосуды заданной формы, в которых происходит направленный рост клеток, что позволит выращивать биоткани, а в будущем и органы.

В премию вошла и интеллектуальная лазерная система для диагностики в хирургии. Что это за системы?

– Скажу несколько слов об одной из таких систем. Как известно, лазеры – неплохой скальпель, и мы подумали – а почему бы не вооружить хирурга таким скальпелем, который бы моментально видел, какую биоткань он режет. Дело в том, что во время операции летят частицы биотканей, притом частицы разных биотканей летят с разными распределениями скоростей в пространстве. Поскольку лазер не только аблирует биоткань, но и может принимать рассеянный от летящих частиц свет и гораздо быстрее, чем реакция человека, идентифицировать вид частиц, испаряемых в данный момент. Эта информация и передается хирургу в виде определенных сигналов. Таким образом, хирург точно знает, что он удаляет именно менингиому, а не здоровую ткань мозга.

То есть эта система позволяет четко определять границы нездоровых тканей, что особенно важно в онкологии. Данная идея неоднократно обсуждалась с академиком В.И. Чиссовым и членом-корреспондентом И.В. Решетовым. Были разработаны и построены интеллектуальные лазерные системы такого типа и с их помощью проведены десятки успешных операций.

Член-корреспондент РАМН, доктор медицинских наук, профессор Игорь Владимирович Решетов:

– Исследования по использованию лазерных информационных технологий начались лет 10 назад. Выступая в разных научных аудиториях, Владислав Яковлевич Панченко пробудил интерес к применению этих разработок в медицине. Была составлена инициативная научная группа по использованию лазерных информационных технологий в медицине, которую возглавляли руководители: от Института проблем лазерных и информационных технологий РАН – В.Я. Панченко, от Научно-исследовательского института нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко РАМН – А.Н. Коновалов и А.А. Потапов, от Московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена – В.И. Чиссов.

В настоящее время из лазерных информационных технологий клинической стала технология прототипирования биологических объектов. Модели изготавливают на этапе уточняющей диагностики, оценки результатов лечения либо последующих корректирующих реабилитационных операций. Легче всего делать прототипы тех органов, где есть опорные структуры. Так, если взять скелет человека, то, пожалуй, нет ни одного отдела, который не подвергся бы исследованию. Естественно, мы стремились не только к накоплению количества наблюдений, но и хотели найти новые, качественно улучшающие жизнь пациента решения. Например, изготовить индивидуальный протез кости, так называемый имплант. Технология уже есть, сейчас мы работаем над тем, чтобы делать эти импланты не путем слепка с симметричной стороны (то есть не путем зеркального переноса недостающего фрагмента), а так,



Игорь Решетов

чтобы в процессе выращивания модели прототипа получался биосовместимый фрагмент.

Что дает технология быстрого прототипирования хирургу и его пациенту?

– Благодаря этой технологии появилась возможность прогнозировать операцию, оптимально подогнать все «запчасти», оценить результативность. Сейчас ведь требования к функциональной реабилитации значительно повысились: люди хотят ни в чем не чувствовать себя ущербными, а для этого как раз нужны те технологии, при которых возможна мельчайшая индивидуальная подгонка. Действия хирурга стали осознанными. То, что раньше приходилось делать на глазок, теперь выполняется точно. Данная техно-

логия – это даже не компьютерное 3D, а реальная, осязаемая вещь.

Вообще, лазерные технологии в медицине – это целый пласт знаний, технологий, над которыми еще надо работать и работать. Сейчас мы активно работаем над применением так называемых интеллектуальных лазерных аппаратов, которые позволяют хирургу рассекавать ткани, менять режимы мощности, глубины рассечения, то есть будут способствовать упрощению, роботизации процесса операции.

Отмечу, что внедрение таких технологий потребует увеличения технического персонала в больнице, так называемых медицинских физиков, которые сейчас в дефиците. ●

**Беседовала
Светлана Синявская**

А.А. Потапов: «В нейрохирургии используются достижения современной биологии во всех ее аспектах»

Лауреат Государственной премии Российской Федерации в области науки и технологий за 2009 год доктор медицинских наук, академик РАМН, заместитель директора Научно-исследовательского института нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко РАМН Александр Потапов рассказал редакции *АН* о достижениях современной нейрохирургии, новейших разработках в этой области и о тесной интеграции фундаментальной биологии и медицинской практики.

Александр Александрович, в последнее время нейронауки развиваются настолько быстро, что можно говорить о настоящей революции в данной области биологии и медицины. Чем в первую очередь это объясняется?

– В арсенале современной нейрохирургии появились абсолютно уникальные, постоянно развивающиеся методы нейровизуализации. Это, прежде всего, рентгеновская компьютерная и магнитно-резонансная томография. Если 40 лет назад мозг в полости черепа был в своеобразном «черном ящике», и хирург видел, что происходит внутри только после трепанации, то сейчас все, что происходит в мозге живого человека мы можем увидеть очень быстро и безопасно для пациента. Благодаря новым методам нейровизуализации появилась возможность изучать не только анатомию мозга и патологических образований, но и визуализировать процессы кровоснабжения и получать количественные характеристики кровотока в миллилитрах на грамм/минуту для разных структур мозга и патологических образований. Это дает возможность увидеть изменения кровоснабжения при раз-

витии различных патологических процессов, а также в ходе их лечения. В клинической практике все шире применяются методы, которые позволяют получить карты метаболических изменений живого мозга, – это, прежде всего, позитронно-эмиссионная томография и в последние годы – магнитно-резонансная спектроскопия (по существу молекулярная нейровизуализация). С помощью МРТ-спектроскопии мы можем видеть, как изменяется метаболизм в тканях, например оценивать изменения уровня N-ацетиласпартата, который является маркером повреждения нейронов. Можно видеть эти изменения не только в отдельных точках, но и на целых срезах мозга на разных уровнях. Использование методов нейровизуализации позволяет дифференцировать опухолевый процесс от нарушения кровоснабжения, воспалительных или нейродегенеративных процессов. Современные методы нейровизуализации имеют, с одной стороны, важное прикладное значение, а с другой стороны – являются инструментом фундаментальных исследований метаболических и структурно-функциональных перестроек в процессе развития болезни или в процессе восста-

новления поврежденной нервной ткани. Это уже фундаментальная нейробиология.

Другая возможность, которая открывается сегодня и широко используется в мировой практике, – это возможность наблюдать функционирование живого мозга в процессе выполнения различных действий. Это так называемая функциональная магнитно-резонансная томография. Допустим, мы просим пациента поработать рукой и видим, какие зоны мозга в это время активируются, где находится корковое представительство руки и в каком месте локализовано патологическое образование, к которому мы должны подойти таким образом, чтобы не нарушить функционально значимую структуру мозга. Возможности современной диффузно-тензорной МРТ позволяют видеть проводящие пути мозга. Например, кортикоспинальный тракт, который обеспечивает проведение сигнала по длинным аксонам от пирамидных клеток коры к мотонейронам спинного мозга.

В своей практике Вы используете достижения других фундаментальных наук, не только биологии, но и физики, например. Ваша совместная работа с ко-



Александр Потапов

мандами академика РАН Владислава Панченко из Института проблем лазерных и информационных технологий РАН и академика РАМН Валерия Чисова, директора Московского научно-исследовательского онкологического института имени

П.А. Герцена получила Государственную премию РФ в области науки и технологий за 2009 год. В чем суть разработанной вами и успешно применяемой на практике технологии?

– Здесь оказалось очень успешным сотрудничество с физика-

ми – в нашем арсенале появилась такая уникальная возможность с помощью современных методов быстрого прототипирования полностью воспроизвести точную копию любого органа человека, любой части тела или всего тела. Сегодня насчитывается свыше десятка методов прототипирования. Они позволяют, скажем, из жидкого полимера с помощью стереолитографа, управляемого компьютером, получить реальную копию виртуальной модели. Есть и другие методы быстрого прототипирования, например – порошковая металлургия, с помощью которой из порошка металла, а также специальной лазерной технологии и управляющего компьютера можно воспроизвести полную копию объекта очень сложного по конфигурации.

Отечественные ученые разработали стереолитографы, управляемые компьютерами, которые дают возможность полностью повторить объект, заложенный и выстроенный в компьютере. Скажем, мы делаем компьютерную томографию человека – его любого органа, мозга либо сосуда, получаем трехмерное изображение, достраиваем недостающую часть поврежденного органа в виртуальном пространстве, посылает на управляющий компьютер. В результате стереолитограф в течение короткого времени полностью выстраивает из жидкого полимера в твердом виде реальную полную копию поврежденного объекта.

А как все начиналось?

– В 90-х гг. прошлого века, когда мы начали этим заниматься, было не очень понятно, насколько это будет востребовано. Мы прочитали публикации о методах идентификации останков царской семьи. Ученые Института проблем лазерных и информационных технологий использовали метод стереолитографии для создания точных

копий найденных черепов и их фрагментов. Посчитав, что эта методика может быть использована в реконструктивной нейрохирургии, мы быстро включились в процесс разработки. Первые наши модели-копии были грубоваты. Но по мере совершенствования метода, оказалось, что потенциал данной технологии в клинической практике огромен.

В чем заключается преимущество метода быстрого прототипирования?

– При сложнейших дефектах и деформациях костных структур используются различные импланты. В мире сегодня имплантируется несколько тонн металла, и титана в частности. Например, для реконструкции позвоночника имплантируют искусственные диски, стабилизирующие системы. Но импланты, которые устанавливаются человеку, готовятся заранее. Потом хирург во время операции старается из нескольких размеров подобрать тот, который подходит для данного пациента. Так вот, метод быстрого прототипирования позволяет изготавливать импланты строго индивидуально для каждого человека с учетом его реальной анатомии.

Допустим, пациенту нужно поменять правый тазобедренный сустав. Ему делают трехмерное изображение левого здорового тазобедренного сустава, и с помощью современных методов быстрого прототипирования получают имплант тазобедренного сустава, сохраняя все размеры, особенности анатомии и т.д. Аналогично и в нейрохирургии – у человека повреждена одна часть лица, пластический хирург должен собрать вторую по подобию сохраненной части. Мы получаем виртуальное трехмерное изображение черепа, потом берем сохраненную часть, «переворачиваем» ее и встраиваем в разрушенную. В результате получаем полностью

восстановленный симметричный череп. Если разрушена центральная часть лица, мы используем виртуальную «донорскую» трехмерную картинку и встраиваем недостающую центральную часть. За многие годы практического применения компьютерной томографии накопился огромный банк изображений, который можно использовать для того, чтобы в виртуальном пространстве подобрать подходящую конфигурацию данного органа.

Метод быстрого прототипирования разрабатывают и в других странах, например в Японии, США, Германии. Но ваша технология уже успешно используется в 50 медицинских центрах. В чем конкурентоспособность отечественной технологии?

– На сегодняшний момент в мире существуют фирмы, которые производят подобные импланты «под заказ». Но наша технология отличается тем, что хирург сам участвует в процессе изготовления импланта для реконструкции. Однако главная задача врача – это восстановление не только костных структур, но и структур нервных тканей, в частности отдельных нейронов.

То есть высказывание «нервные клетки не восстанавливаются» все-таки не верно?

– Тезис о том, что нервная клетка не восстанавливается, озвученный лауреатом Нобелевской премии Сантьяго Рамон-и-Кахалем, сегодня пересмотрен. Совместная работа с биологами, которые занимаются проблемами восстановления структуры нервных клеток, позволит как можно быстрее внедрить в практику достижения экспериментальной нейробиологии.

Сегодня уже известно несколько подходов, которые могут способствовать восстановлению нервной клетки. Известно, что есть ряд нейротропных факторов, стимулирующих процессы

регенерации клетки. Литий – простейший элемент, оказывает, тоже способствует регенерации. Есть различные соединения, которые блокируют ферменты, препятствующие регенерации нейрона. Экспериментально доказано, что в процессах восстановления нейронов могут использоваться методы нейротрансплантологии. Однако для применения в клинике мы ждем прорыва в этой области нейробиологии, когда можно будет действительно использовать эти достижения и внедрить их в медицинскую практику.

То есть медицинская практика и фундаментальная биология интегрированы в большей степени, чем может казаться?

– В нейрохирургии используются достижения современной биологии во всех ее аспектах. В частности, когда мы изучаем процессы повреждения мозга в результате инсульта, либо травмы, либо опухолевых поражений, мы занимаемся изучением биологии процесса. Как развивается этот процесс в нервной ткани? Какие механизмы способствуют тому, что данный процесс либо приведет к заживлению, либо к гибели нервной клетки? Поэтому мы должны знать биологию данного процесса.

Какими должны быть наши воздействия для того, чтобы восстановить поврежденную нервную ткань – все ее элементы: нейроны, глиальный комплекс, сосудистую сеть? Как вещества из крови достигают конечной цели – клеток мозга, преодолевая уникальный гематоэнцефалический барьер? И мы можем управлять этими процессами сегодня с лечебным эффектом.

Для нас очень важны те направления, которыми занимается генетика. Сегодня известно, что характер реакции мозга на любое повреждение определяется не только самим воздействием,

но и генетическими особенностями каждого конкретного индивидуума, то есть генетическим профилем. Есть данные о том, что генетический полиморфизм по ряду генов определяет выраженность реакции нервной ткани на повреждение. Любое повреждение вызывает ответную универсальную реакцию – воспаление. По отношению к нервной системе – это нейровоспаление, которое проявляется в виде повышения проницаемости гематоэнцефалического барьера, отека мозга (внутриклеточного, межклеточного, смешанного), нарушения системы циркуляции ликвора, кровоснабжения и метаболизма. Характер этих реакций и последующих восстановительных процессов может определяться неким своеобразием генома человека, или так называемым генетическим полиморфизмом. В одном из номеров вашего журнала опубликован обзор про-

фессора В.С. Баранова (см. *Acta Naturae*, т. 1, № 3, 2010. – *Прим. ред.*), посвященный генетическому полиморфизму и перспективам медицинской геномики. Сегодня это направление очень актуально и для нас, клиницистов, когда при прогнозировании течения болезни и возможных ее исходов, следует принимать во внимание не только этиологию, патогенез и клинические проявления болезни, но и генетический профиль человека, его факторы риска, которые могут привести к тому или иному сценарию развития болезни.

И обратный процесс – какие методы клинической медицины используются при изучении более фундаментальных проблем?

– Возможности современных технологий нейровизуализации, о которых мы уже говорили ранее, позволяют изучать и более фундаментальные проблемы – взаи-

моотношение структуры и функций головного мозга. Например, как у разных людей, правой или левой с доминированием одного или другого полушария (или с отсутствием доминирования), функционирует мозг, если возникает некий патологический очаг? Как перестраивается мозг в процессе старения, развития, патологического воздействия? Это уже изучение фундаментальных основ жизнедеятельности нервной системы (и мозга, в частности) в норме и патологии. Сегодня эти методы, которые абсолютно востребованы в клинической практике – в прикладной области медицины, одновременно используются и работают на изучение фундаментальных проблем нейробиологии – науке о мозге, о нервной системе... ●

**Беседовала
Елена Новосёлова**

Наука в вузах: приказано жить

Беспрецедентная финансовая поддержка ведущих вузов России – в 90 миллиардов рублей – всколыхнула профессиональное сообщество. Сделав ставку на развитие университетской науки, государство перешло к конкретным действиям по ее усилению. После определения вузов-лидеров – исследовательских и федеральных, которым, помимо статусов, выделяют еще и дополнительные средства, Минобрнауки объявило новые конкурсы для вузов – на кооперацию с бизнесом, укрепление инновационной инфраструктуры и привлечение ведущих ученых. Уже этой осенью победителей ожидают многомиллионные вливания, которые позволят реализовать самые смелые и амбициозные проекты.

Овнушительной финансовой поддержкой российских вузов стало известно в конце прошлого года на съезде «Единой России». Тогда **Владимир Путин** пообещал дополнительно выделить университетам 90 миллиардов рублей на три года. Позже – в январе этого года на Всемирной конференции министров образования в Лондоне глава Минобрнауки **Андрей Фурсенко** объявил, что в России начинается модернизация высшей школы, направленная на повышение научного потенциала университетов. При этом он выразил уверенность, что лучшие вузы страны в скором времени смогут составить конкуренцию не только РАН, но и ведущим лабораториям и институтам мира.

Добиться этих целей власти собираются благодаря комплексу мер. Дополнительные средства Минобрнауки планирует потратить по следующим направлениям:

- Поддержка программ развития Московского и Санкт-Петербургского госуниверситетов.
- Поддержка федеральных университетов в части модернизации научно-исследовательского процесса и инновационной деятельности.

- Поддержка национальных исследовательских университетов.
- Развитие кооперации вузов и производственных предприятий.
- Привлечение ведущих ученых в российские вузы.
- Развитие инновационной инфраструктуры в вузах.

ЛОГИЧНО И ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНО

Целенаправленные шаги государства по укреплению науки в университетах вызвали в профессиональном сообществе оживленные дискуссии. Нашлось немало противников провузовского варианта развития национальных исследований и разработок. В качестве аргумента они обычно ссылаются на особенности организации науки в России и традиционно сильные позиции Академии. Многим непонятно, с чего вдруг власти стали так активно поддерживать вузовскую науку. На самом деле ничего неожиданного в этой политике нет. С середины 2000-х годов Минобрнауки борется с монополизмом РАН, пытаясь сместить центр исследовательской тяжести на университеты. Долгие годы наука там развивалась по большей части в инициативном порядке, без серьезного финансирования со стороны государства. Теперь укрепление вузовской

науки становится приоритетом, что фиксируется во всех ключевых документах. В частности, в Стратегии развития науки и инноваций в РФ, которую приняли в феврале 2006 г. и которая рассчитана до 2015. В ней указывается, что «обособленное существование научных и образовательных структур снижает потенциал их развития, уменьшает вклад в развитие экономики и общества, препятствует полноценному вхождению в мировое научно-образовательное пространство». О необходимости «интегрировать образование и научную деятельность» говорилось, кстати, еще в 2004 году в президентском послании Федеральному Собранию.

В Стратегии предлагается целый ряд мер для развития вузовской науки. В первую очередь формировать сеть ведущих исследовательских университетов – «крупнейших научных центров, которые в равной степени эффективно осуществляют подготовку специалистов всех уровней и выполняют исследования и разработки мирового класса». Именно такой подход и такие формулировки почти через пять лет (в 2009–2010 гг.) использовались при отборе исследовательских университетов.

Среди других мер в Стратегии указывается на необходимость развития кадрового потенциала, включая предоставление молодым ученым крупных грантов для проведения исследований, приобретения научного оборудования, создания малых стартовых фирм, а также реализацию схем мобильности кадров между НИИ, вузами, предприятиями. И наконец, еще одно обязательное условие – развитие инфраструктуры. Все запланированные мероприятия государство логично и последовательно осуществляет.

ЛИДЕРЫ ЕСТЬ

Реформа высшей школы, или, как предпочитают говорить в профильном министерстве, – модернизация, началась с институциональных преобразований. А именно – формирования группы ведущих вузов.

Со временем, по прогнозам Минобрнауки, в стране останется не более 50 университетов, а в целом – около 150–200 конкурентоспособных вузов. Об этом Андрей Фурсенко впервые заявил два года назад на встрече с президентом России в МИФИ. Примерно в то же время началась работа по формированию в стране статусных вузов – федеральных и национальных исследовательских.

На сегодняшний день действует два федеральных университета (Южный и Сибирский), на стадии становления еще пять: Приволжский, Уральский, Северный (Арктический), Северо-Восточный и Дальневосточный. Этот проект, можно сказать, геополитический. Стратегическая задача федеральных университетов, которые создаются по решению Правительства РФ путем объединения нескольких вузов, заключается в том, чтобы обеспечить качественное образование и предоставить возможность заниматься высокой наукой, то есть

стать научно-образовательными центрами своих регионов. Это позволит развиваться экономике, закреплять квалифицированных специалистов на Дальнем Востоке, в Сибири, на Урале и т.д.

Миссия национальных исследовательских университетов (НИУ) состоит в том, чтобы, во-первых, закрыть кадровую потребность высокотехнологичных секторов экономики – атомной промышленности, металлургии, машино-, судостроения и других. А во-вторых, развивать науку, главным образом прикладную, с целью коммерциализации результатов исследований.

По итогам двух конкурсов, которые проходили в конце 2009 и начале 2010 г., категорию НИУ присвоили 29 вузам. Помимо престижного статуса победителям пообещали внушительные денежные вливания – по 1.8 миллиарда рублей каждому на пять лет. В общей сложности проект НИУ обойдется госказне почти в 50 миллиардов рублей.

Еще два учебных заведения, которые исторически, де-факто являются столпами университетского образования и науки – МГУ и СПбГУ, также получили особые полномочия и очень широкие права. По закону им присвоили особый статус «старейших вузов страны, имеющих огромное значение для развития российского общества».

Но даже применительно к флагманам господдержка будет строиться не просто на «давании» денег: как исследовательские и федеральные, так и МГУ и СПбГУ получают бюджетные деньги под конкретные программы развития.

ПРАВИТЕЛЬСТВО СТИМУЛИРУЕТ

Выделение группы лидеров – первый серьезный шаг в модернизации высшего образования России. Следующим стали дополнитель-

ные меры поддержки научной и инновационной деятельности вузов. «Развитие исследовательского компонента вузов – один из важнейших приоритетов политики государства, – заявил в одном из своих выступлений замминистра образования и науки РФ **Алексей Пономарёв**. – Это необходимый элемент инновационной инфраструктуры экономики, механизм генерации новых идей и технологий, их внедрения и тиражирования. Без участия вузов в исследованиях невозможно обеспечить качественную подготовку специалистов для приоритетных направлений научно-технологической модернизации России».

Весной этого года Правительство РФ утвердило три постановления – № 218, 219 и 220, направленные на решение самых острых проблем отечественной науки – ее старение и снижение уровня исследований. По статистике, в российских вузах наукой занимаются не более 15% преподавателей. Значит, далеки от науки и студенты, а без нее образование становится, по сути, бессмысленным. Оно превращается в перемалывание учебников, написанных много лет назад.

По каждому постановлению этим летом были объявлены конкурсы. Победителей ожидают значительные финансовые вливания, которые будут направлены на укрепление кооперации вузов и бизнеса (12 миллиардов рублей на 3 года), развитие инновационной инфраструктуры (8 миллиардов) и привлечение ведущих ученых (12 миллиардов).

Деньги выделяются из антикризисного фонда, так что все три постановления посвящены не исключительно научным исследованиям, а в целом – модернизации системы высшего образования. Соответственно и задачи (по приоритетности) Минобрнауки рас-

ставляет следующим образом:

- 1) передача опыта выполнения научных исследований в вузы, формирование здорового климата конкуренции в России;
- 2) мобилизация научных и управленческих коллективов, чтобы вузы смогли совершить качественный скачок в развитии;
- 3) собственно научные исследования.

О КООПЕРАЦИИ ВУЗОВ И БИЗНЕСА

Новые инструменты, предложенные Правительством, призваны сделать вузы центральным звеном прикладной науки, переломив недоверие бизнеса к их исследовательским компетенциям. Государство пытается ввести вузы в реальный сектор экономики. Причем не только на уровне выполнения отдельных хоздоговоров, как было раньше, но и на уровне реализации стратегических планов развития российских предприятий. В постановлении № 218 указан список из 54 крупнейших государственных и частных компаний, которые к ноябрю этого года должны подготовить программы инновационного развития, учитывая взаимодействие с вузами. По прогнозу замминистра Алексея Пономарёва, в ближайшем времени кооперацию с вузами начнет 20–30 компаний из этих 54. Это будет база для создания так называемых технологических платформ – конгломерата ведущих промышленных фирм, университетов и администраций регионов. Этот заимствованный у Евросоюза инструмент напрямую не подкреплен госсредствами. Речь идет о создании консультационных площадок, формируемых ключевыми заказчиками и исполнителями НИОКР по определенным проблемам. Участники платформ будут заниматься планированием и прогнозированием в своей области, исследованиями рынка и вы-

работкой решений, которые будут определять госполитику.

Для развития наукоемкого производства крайне важно стимулировать как сами вузы, так и предприятия, считают в Минобрнауки. Самый значительный инструмент, появившийся в распоряжении ведомства, – субсидии промышленным компаниям для работы с вузами. На это выделяется 19 миллиардов, 6 из них – в 2010 г. В конкурсе, который объявили в конце июня по 218 постановлению, предлагалось принять участие любым предприятиям, в том числе иностранным, которые представят на рассмотрение экспертов свои проекты заказа НИОКР у вузов. Субсидия выделяется на срок от 1 до 3 лет, в сумме до 100 миллионов в год. От компании требуется предоставить софинансирование не меньше полученной от государства суммы.

Конкурс оказался весьма привлекательным для бизнеса: заявки подготовили 416 организаций из 59 регионов. В качестве исполнителей НИОКР выбрано 157 вузов. Суммарный объем запрошенных субсидий превышает 70 миллиардов рублей. Средний объем субсидии – порядка 150 миллионов.

По итогам конкурса победителями признали 57 проектов, из них 33 – в регионах (кроме Москвы и Санкт-Петербурга). Среди победителей оказались такие крупные производственные компании, как самолетостроительная корпорация «МиГ», КАМАЗ, АЛРОСА и другие. В общей сложности проекты будут реализовывать 55 компаний в кооперации с 49 российскими вузами.

Стоит отметить, что конкурс проводится в два этапа. Это решено было сделать, чтобы пополнить портфель заявок, так как не все организации успели подготовить необходимые документы. Результаты второго этапа объявят до 5 октября.

Постановления правительства № 218 и 219 в вузовской среде рассматривают как второй этап инновационного развития вузов. Первый был связан с малым бизнесом – принятием в прошлом году 217-ФЗ, который разрешил университетам учреждать малые предприятия. Теперь наступило время солидного, крупного бизнеса, который будет заказывать у вузов НИОКР.

РАЗВИТИЕ ИННОВАЦИОННОЙ ИНФРАСТРУКТУРЫ

По 219 постановлению проводился отбор программ развития инновационной инфраструктуры вузов. В конкурсе приняли участие 199 университетов. Победителей определяли по результатам анализа научного, образовательного и инновационного потенциала за последние 3 года и представленных на их основе программ развития. Конкурсная комиссия выбрала 56 лучших. Большинство из них (14) – вузы Москвы (МГУ, Бауманка, МФТИ, МИФИ, МИЭТ и другие). Но в целом география победителей широкая – 36 субъектов РФ всех 8 федеральных округов: Дальневосточный – 4, Приволжский – 7, Северо-Западный – 7, Северо-Кавказский – 3, Сибирский – 8, Уральский – 4, Центральный – 20, Южный – 3.

Каждый вуз получит до 150 миллионов рублей. Средства можно тратить по строго определенным направлениям:

- 1) развитие объектов инновационной инфраструктуры: бизнес-инкубаторов, технопарков, центров сертификации, трансфера технологий, коллективного пользования, научно-технической информации и других;
- 2) оценку результатов интеллектуальной деятельности и их правовую охрану;
- 3) реализацию и разработку целевых программ подготовки и повышения квалификации кадров

в сфере малого инновационного предпринимательства, в том числе для студентов, аспирантов и молодых ученых, а также разработку учебно-методологического и научно-методического обеспечения для субъектов малого и среднего предпринимательства;

4) стажировку и повышение квалификации сотрудников вузов в сфере инновационного предпринимательства и трансфера технологий в иностранных университетах;

5) консалтинговые услуги иностранных и российских экспертов в сфере трансфера технологий, создание и развитие малых инновационных компаний, включая привлечение профессорско-преподавательского состава к нормативно-методическому и практическому обеспечению создания таких компаний.

ПРИВЛЕЧЕНИЕ ВЕДУЩИХ УЧЕНЫХ

Постановление № 220 подразумевает привлечение в вузы на конкурсной основе лучших специалистов мира во вновь создаваемые лаборатории. Для этого из федерального бюджета выделят 12 миллиардов рублей. Учитывая, что сумма одного гранта составляет 150 миллионов, то количество победителей в конкурсе может достичь порядка 80 человек.

Всего на конкурс поступило 507 заявок от 179 вузов. Из них больше всего подано по направлениям: «Физика», «Информационные технологии и вычислительные системы», «Науки о земле» и «Науки о материалах» (около 40 по каждому). Меньше всего (до пяти) – по сельскохозяйственным наукам и машиноведению.

Конкуренция между вузами жесткая, тем более некоторые из них подали несколько заявок.

Отличился МГУ им. М.В. Ломоносова, направивший 30 заявок. СПбГУ и МИФИ – по 21. Подавляющее большинство вузов рискнуло подать от 3 до 6 заявок.

В Минобрнауки неоднократно подчеркивали, что ведущих ученых будут определять не по паспорту, то есть задача у этого конкурса состоит не в том, чтобы привлечь иностранцев. Главное, чтобы были реальные научные достижения. Однако многие вузы делают ставку на зарубежных ученых. Таковых в списке претендентов на многомиллионный грант – около 130.

Приглашенные ученые должны будут возглавить в вузе вновь созданную лабораторию и проработать там не менее четырех месяцев в году. Как объяснили накануне конкурса представители Минобрнауки, при рассмотрении заявок эксперты в первую очередь будут обращать внимание не на то, какие научные исследования предлагает проводить вуз, а на то, удастся ли при реализации данной заявки сформировать лабораторию мирового уровня. Под показателями эффективности проекта Минобрнауки понимает создание лаборатории, которая будет способна продуктивно и успешно работать после завершения проекта, который рассчитан на 3 года, ее сотрудники смогут публиковаться в рейтинговых научных журналах, получать заказы от предприятий, патенты на разработки, выигрывать в новых конкурсах и т.д.

В отличие от остальных правительственных инициатив, эта – по привлечению в вузы ведущих ученых – вызывает наиболее спорные оценки в профессиональном сообществе. Много критиков и много скептиков. А те, кто в целом поддерживают идею, опасаются за ее качественную реализацию, в частности за грамотную и честную экспертизу заявок, а соответственно определение победителей. Насколько обоснованы эти опасения, станет ясно, когда объявят результаты конкурса. Тогда уже можно будет оценить уровень выигравших заявок и соответственно ученых, которые должны будут создать лаборатории мирового уровня.

Итак, государство поддерживает вузовскую науку – причем не только за счет финансирования университетов, которым присуждаются различные статусы, но и с помощью сопутствующих инициатив. Тем самым государство преследует цели: повысить качество подготовки специалистов в российских вузах, развить исследовательскую и технологическую базу вузов, увеличить их инновационную активность.

На опасения скептиков, что вузы не справятся с возложенными на них задачами, что деньги и уникальное оборудование попадут в руки тех, кто не сумеет ими воспользоваться эффективно, у руководства Минобрнауки ответ один: никто и не думает распределять ресурсы по огромному числу вузов. Победителям предстоит пройти жесткий конкурс. Спокойной жизни им не обещают. А если кто-то из них в ходе реализации программы начнет сдавать позиции, то статус у вуза могут отнять. В данном случае остается только верить на слово чиновникам. Посмотрим, что выйдет из этого грандиозного по своим масштабам проекта и кто окажется прав – скептики или оптимисты. ●

Марина Муравьева

Подведены итоги конкурсов по кооперации бизнеса и вузов

Иван Стерлигов, STRF.ru

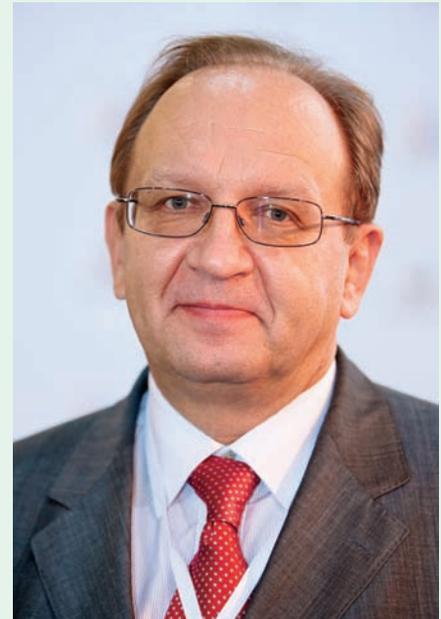
Подведены итоги второй очереди конкурсов по кооперации бизнеса и вузов. Об успехах и сложностях господдержки по постановлениям Правительства РФ № 218 и 219 рассказал замминистра образования и науки Сергей Мазуренко на брифинге 6 октября.

В качестве инструмента правительством предложены субсидии двух типов – на кооперацию бизнеса и вузов (постановление № 218, 19 млрд рублей) и на создание вузовской инновационной инфраструктуры (постановление № 219, 8 млрд рублей). Решение о выделении таких денег разовое, и Минобрнауки осваивает полученные средства в быстрые сроки. Конкурсы уже проведены, последние списки победителей появились на официальном сайте программы (см. Приложение).

На конкурсе по инновационной инфраструктуре подано 199 заявок, допущено к участию 197, победило 56, т.е. конкурс составил 3.5.

Представлено 35 регионов, причем 20 заявок пришлось на Центральный федеральный округ, 8 – на Сибирский, по 7 – на Приволжский и Северо-Западный. «Мы стремимся сделать так, чтобы заявки были одного уровня», – прокомментировал замминистра проблему распределения победителей по регионам.

Как и предполагалось, среди выигравших 5 федеральных (ФУ) и 20 национальных исследовательских университетов (НИУ). Победители получают до 50 млн рублей в год на три года на создание и развитие центров трансфера технологий, управления интеллектуальной собственностью, стимулирования инноваций и т.д.



Сергей Мазуренко

С постановлением № 218 ситуация иная. Интерес со стороны заявителей оказался заметно выше, но до конкурса были допущены лишь 553 из 806 поданных заявок. Победило 112 проектов от 107 компаний и 76 вузов. В числе прочих деньги дойдут до 25 НИУ и 6 ФУ.

По условиям конкурса деньги для оплаты НИОКР в вузе получает не сам вуз, а его деловой партнер, который должен дополнительно предоставить сумму, равную или большую выделяемой государством. Вдобавок, 20% от такого софинансирования должно идти непосредственно на науку и технологии.

Максимальный размер субсидии от государства – 100 млн рублей в год на срок до трех лет, т.е. всего до 300 млн. При этом суб-

Рис. 1. Распределение победителей первой очереди конкурса по кооперации бизнеса и вузов по приоритетным направлениям президентской комиссии по модернизации.



Вузы-лидеры по участию в конкурсах кооперации и инновационной инфраструктуры

Вузы	Программы кооперации	Инновационная инфраструктура
МГТУ им. Н.Э. Баумана	3	1
МФТИ	3	1
МИСиС	3	1
Уральский федеральный университет им. Б.Н. Ельцина	3	1
СПбГЭТУ «ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова (Ленина)	3	1
Казанский (Приволжский) федеральный университет	3	1
МГУ им. М.В. Ломоносова	3	1

сидия в год должна быть больше 20% от среднегодовой выручки компании-участника конкурса за три последних года. Возможно, поэтому фактический средний размер субсидии на весь срок контракта составил всего 70 млн рублей, менее четверти от максимально возможной суммы. По словам Сергея Мазуренко, «хороший проект можно выполнить и за 30 млн», но вот с участниками, требовавшими всего 3–5 млн, пришлось расстаться. Тем не менее за счет крупных участников общий размер «внебюджетки» по конкурсу превысил 20 млрд рублей. Государство по итогам двух прошедших очередей отбора вложит 18 млрд

Глава департамента стратегического развития Минобрнауки **Игорь Реморенко** добавил, что за победителями будет установлен тщательный контроль. Сейчас создается электронная система, с помощью которой предприятия и вузы будут отчитываться о кооперации раз в месяц. Запоздало осознав, что за расходом средств будут строго следить, два предприятия сняли свои победившие заявки.

Комментируя напоследок значительные изменения в структуре финансирования российской науки, Сергей Мазуренко дал журналистам такой совет:

«Мы должны грамотно информировать общественность. Очень часто у нас возникают разгово-



Игорь Реморенко

ры о недофинансировании того или иного блока науки. У нас сейчас разговор идет о том, что государство уделяет науке большое внимание. Но научный ландшафт России состоит из нескольких областей. Когда я учился на Физтехе, Капица говорил нам: есть фундаментальные и поисковые исследования, но наука есть одна. Научные исследования у нас ведутся в разных организациях. Без фундаментальной науки мы тоже не можем обойтись. Сейчас фундаментальные исследования давно ушли от ньютоновских экспериментов, нужны мощнейшие инструменты и установки.

Самые развитые страны в одиночку не справляются с созданием таких установок. Мы принимаем самое активное участие в проекте БАК, в ITER, в проекте лазера на свободных электронах. Это говорит о том, какое внимание уделяется фундаментальной науке. Стоит также задача развивать крупные установки в России – достраивается ПИК в Гатчине. Но сейчас мы говорим про прикладную науку». ●

Приложение

Список победителей открытого публичного конкурса по отбору организаций на право получения субсидий на реализацию комплексных проектов по созданию высокотехнологического производства (II очередь)

№ п/п	Инициатор проекта	Головной вуз	Наименование проекта	Номер заявки
1	Открытое акционерное общество «Нижнекамск-нефтехим»	Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет»	Повышение эффективности получения мономеров синтетических каучуков путем разработки и промышленной реализации высокотехнологического производства отечественных катализаторов дегидрирования изоамиленов	2010-218-02-173
2	Открытое акционерное общество «Авиационная корпорация «Рубин»	Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»	Создание высокотехнологичного производства фрикционных композиционных углеродных материалов для тормозных систем авиационного и другого вида транспорта	2010-218-02-116
3	Федеральное государственное унитарное предприятие федеральный научно-производственный центр «Научно-исследовательский институт измерительных систем им. Ю.Е. Седакова»	Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»	Организация высокотехнологичного производства продукции микроэлектроники на КНД-структурах и микросистемной техники с элементами монолитных интегральных схем для экстремальных условий эксплуатации	2010-218-02-136
4	Общество с ограниченной ответственностью «Научно-производственное предприятие «Тасма»	Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет»	Разработка и организация производства конкурентоспособных на мировом рынке фоторегистрирующих материалов	2010-218-02-132
5	Открытое акционерное общество «Концерн «Океанприбор»	Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова (Ленина)»	Организация производства систем гидроакустического мониторинга акватории на базе покровных антенн в местах размещения нефте- и газодобывающих платформ в районе Арктического шельфа	2010-218-02-009
6	Закрытое акционерное общество «Петрозаводский завод бумагоделательного машиностроения»	Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Петрозаводский государственный университет»	Создание ресурсосберегающего производства экологически безопасных транспортно-упаковочных комплектов (далее ТУК) для хранения и перевозки отработавшего ядерного топлива	2010-218-02-081
7	Открытое акционерное общество «Научно-производственная корпорация «Иркут»	Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Иркутский государственный технический университет»	Разработка и внедрение комплекса высокоэффективных технологий проектирования, конструкторско-технологической подготовки и изготовления самолета МС-21	2010-218-02-312
8	Открытое акционерное общество «Российские железные дороги»	Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный университет путей сообщения»	Инновационная ресурсосберегающая производственно-транспортная система, обеспечивающая безопасную и быструю перевозку грузов с конкурентным уровнем затрат на эксплуатацию и ремонт основных средств железнодорожного транспорта (на полигоне Рыбное – Челябинск)	2010-218-02-324

ФОРУМ

9	Открытое акционерное общество «Корпорация «Фазотрон – Научно-исследовательский институт радиостроения»	Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский авиационный институт (государственный технический университет)»	Разработка высокотехнологичного производства многофункциональных бортовых радиолокационных систем (МБРЛС) для различных носителей народнохозяйственного и оперативно-тактического назначения	2010-218-02-210
10	Открытое акционерное общество «ЭЛЕКОНД»	Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования Ижевский государственный технический университет	Организация высокотехнологичного производства конденсаторов нового поколения	2010-218-02-259
11	Общество с ограниченной ответственностью «ЛАДА-ЛИСТ»	Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Тольяттинский государственный университет»	Разработка модельного ряда легких коррозионно-стойких автомобилей с трансформируемым кузовом на базе агрегатов «Chevrolet Niva» и ДВС повышенной мощности, организация гибкого автоматизированного производства элементов облицовки кузова из термопластичных полимеров и Инженерного центра технологий экструзионного производства	2010-218-02-130
12	Закрытое акционерное общество «Транзас»	Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный университет»	Разработка программного комплекса для проведения расчетов однофазных и трехфазных многокомпонентных потоков для статических и динамических режимов, связанных с добычей и транспортировкой углеводородного сырья на Арктическом континентальном шельфе (импортозамещение наукоемких технологий)	2010-218-02-137
13	Общество с ограниченной ответственностью фирма «ЛЕСТЕХКОМ»	Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Марийский государственный технический университет»	Разработка энергоэффективной многофункциональной лесозаготовительной машины нового поколения с повышенной надежностью, производительностью и комфортностью оператора с применением ресурсосберегающих технологий	2010-218-02-232
14	Общество с ограниченной ответственностью «Аби Продакшн»	Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский физико-технический институт» (Государственный университет)	Разработка лингвистических технологий для системы машинного перевода и системы семантического поиска и анализа данных	2010-218-02-220
15	Открытое акционерное общество специального машиностроения и металлургии «Мотовилихинские заводы»	Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Пермский государственный технический университет»	Создание высокотехнологичного машиностроительного производства на основе современных методов проектирования изделий и гибких производственных процессов прецизионной обработки материалов	2010-218-02-249
16	Закрытое акционерное общество «Чебоксарский электроаппаратный завод»	Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Уфимский государственный нефтяной технический университет»	Разработка и организация серийного производства мощных высоковольтных частотно-регулируемых приводов (ВЧРП)	2010-218-02-051
17	Общество с ограниченной ответственностью «Объединенная компания «СИБШАХТОСТРОЙ»	Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Сибирский государственный индустриальный университет»	Разработка технологии и создание пилотного образца автоматизированного энергогенерирующего комплекса, работающего на отходах углеобогащения	2010-218-02-174
18	Закрытое акционерное общество «Терна Полимер»	Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова»	Разработка высокоскоростных процессов и освоение производства облицовочных материалов нового поколения на основе гибридных наноконпозиций полимеров олефинового ряда	2010-218-02-223

ФОРУМ

19	Открытое акционерное общество «Ивановский завод тяжелого станкостроения»	Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Ивановский государственный энергетический университет им. В.И. Ленина»	Создание серии высокоскоростных энергоэффективных технологических комплексов с цифровой системой управления для прецизионной обработки деталей сложной конфигурации	2010-218-02-031
20	Закрытое акционерное общество «Полупроводниковые приборы»	Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный политехнический университет»	Разработка и организация серийного производства высокотехнологичного комплекса для диагностики, профилактики и лечения онкологических заболеваний различных локализаций методом фотодинамической терапии	2010-218-02-012
21	Открытое акционерное общество «ЛОМО»	Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный университет информационных технологий, механики и оптики»	Разработка и организация производства оптико-цифрового диагностического комплекса для телемедицины	2010-218-02-104
22	Закрытое акционерное общество «Волгостальконструкция»	Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»	Создание мобильной высокотехнологичной установки по переработке и утилизации отходов нефтеперерабатывающих предприятий (кислых гудронов). Производство нового поколения связующих для асфальтобетонных смесей (битумов)	2010-218-02-218
23	Федеральное государственное унитарное предприятие «Завод «Прибор»	Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Южно-Уральский государственный университет»	Создание серийного высокотехнологичного производства автоматизированного интеллектуального комплекса для энергоэффективного управления режимами работы систем теплоснабжения зданий и сооружений	2010-218-02-286
24	Федеральное государственное унитарное предприятие «Управление специального строительства по территории № 9 при Федеральном агентстве специального строительства»	Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Сибирский федеральный университет»	Производство ресурсосберегающих полнофункциональных строительных модулей (конструкций, домокомплексов) для массового строительства малоэтажных молодежных поселков (пилотная площадка в ЗАТО г. Железнодорожск)	2010-218-02-027
25	Открытое акционерное общество «Концерн «Созвездие»	Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования Балтийский государственный технический университет «ВОЕНМЕХ» им. Д.Ф. Устинова	Распределенная система контроля доступа с возможностью определения наличия взрывчатых и наркотических веществ на базе анализа отпечатка пальца	2010-218-02-048
26	Общество с ограниченной ответственностью «ПРОИЗВОДСТВЕННО-ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБЪЕДИНЕНИЕ «МЕДТЕХНИКА»	Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Казанский государственный технологический университет»	Разработка и освоение производства медицинских инструментов повышенной биосовместимости, включая импланты, на основе новых наноструктурированных материалов и технологий	2010-218-02-097
27	Закрытое акционерное общество «БИННОФАРМ»	Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»	Создание высокотехнологичного производства продуктов клеточных технологий для регенеративной медицины	2010-218-02-172
28	Федеральное государственное унитарное предприятие «Государственный Завод «Пульсар»	Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»	Разработка и организация серийного выпуска электронных твердотельных компонентов на гетероструктурах GaN	2010-218-02-002

ФОРУМ

29	Общество с ограниченной ответственностью «ИБС Экспертиза»	Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования Российская экономическая академия им. Г.В. Плеханова	Создание программно-технического комплекса (информационной системы) с разработкой типовых технологий динамического моделирования и прогнозирования экономического развития и потребности в трудовых ресурсах для социально-экономических систем различного уровня (в том числе всероссийского, регионального, отраслевого, системообразующих предприятий и организаций, населения)	2010-218-02-078
30	Открытое акционерное общество «Машиностроительный завод «ЗиО-Подольск»	Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС»	Создание сквозной энергосберегающей технологии термообработки ответственных изделий атомной энергетики на основе энергоэффективного оборудования	2010-218-02-222
31	Общество с ограниченной ответственностью Производственно-инвестиционная компания «Диагомит-Инвест»	Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Пензенский государственный университет архитектуры и строительства»	Создание высокотехнологичного производства по выпуску пеностеклокерамики на основе опалкристиобалитовых пород	2010-218-02-246
32	Открытое акционерное общество «Мичуринский завод «Прогресс»	Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Тульский государственный университет»	Разработка и серийное производство конкурентоспособного многооборотного интеллектуального электропривода нового поколения для управления, регулирования и мониторинга запорной арматурой систем автоматизации предприятий, газовых и нефтяных магистралей, ТЭЦ, ГРЭС, ГЭС и АЭС	2010-218-02-018
33	Открытое акционерное общество «Магнитогорский метизно-калибровочный завод «ММК-МЕТИЗ»	Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Магнитогорский государственный технический университет им. Г.И. Носова»	Создание высокотехнологичного производства стальной арматуры для железобетонных шпал нового поколения на основе инновационной технологии термомодеформационного наноструктурирования	2010-218-02-053
34	Закрытое акционерное общество «Новомет-Пермь»	Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский государственный университет нефти и газа им. И.М. Губкина»	Создание высокотехнологичного производства энергоэффективных, высоконадежных, конкурентоспособных на мировом рынке установок погружных насосов и практическая реализация технологий их применения для механизированной добычи нефти в осложненных условиях и повышения нефтеотдачи пластов	2010-218-02-054
35	Общество с ограниченной ответственностью «Авиакомпания Волга-Днепр»	Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования Ульяновский государственный университет	Автоматизированная система прогнозирования и предотвращения авиационных происшествий при организации и производстве воздушных перевозок	2010-218-02-068
36	Открытое акционерное общество «Научно-производственное предприятие теплофизического приборостроения «ОСТЕРМ СПб»	Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова (Ленина)»	Создание инновационной технологии производства термоэлектрических элементов для охлаждения и генерации электричества	2010-218-02-083
37	Закрытое акционерное общество «Завод Премиксов №1»	Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Белгородский государственный университет»	Разработка промышленной технологии крупнотоннажного производства лизина и побочных продуктов на основе глубокой переработки зерна и кадровое обеспечение производства	2010-218-02-099

ФОРУМ

38	Общество с ограниченной ответственностью «Унискан»	Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Новосибирский государственный университет»	Создание высокотехнологичного производства наукоёмких систем медицинского мониторинга нового поколения	2010-218-02-109
39	Общество с ограниченной ответственностью «Центр новых и инновационных технологий СУЭК»	Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова»	Создание высокотехнологичного производства (опытная установка) бензина путем глубокой переработки бурых углей	2010-218-02-125
40	Закрытое акционерное общество «Транзас»	Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Ивановский институт государственной противопожарной службы Министерства Российской Федерации по делам гражданской обороны, чрезвычайным ситуациям и ликвидации последствий стихийных бедствий»	Разработка программно-технического комплекса обнаружения и прогнозирования крупномасштабных природных пожаров	2010-218-02-139
41	Открытое акционерное общество «Савеловский машиностроительный завод»	Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования Московский государственный технологический университет «Станкин»	Разработка и создание высокотехнологичного быстро перенастраиваемого автоматизированного замкнутого производства по выпуску крупногабаритных металлоконструкций повышенной прочности и точности для атомной, энергетической, аэрокосмической, нефтяной и других отраслей промышленности Российской Федерации	2010-218-02-159
42	Открытое акционерное общество «Металлист»	Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский государственный профессионально-педагогический университет»	Разработка комплексного проекта и создание высокотехнологичного производства железнодорожных тележек для грузовых вагонов на основе инновационных решений	2010-218-02-201
43	Федеральное государственное предприятие Производственное объединение «Север»	Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Новосибирский государственный технический университет»	Исследование, разработка и организация промышленного производства мехатронных систем для энергосберегающих технологий двойного назначения	2010-218-02-297
44	Закрытое акционерное общество «Нау-сервис»	Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»	Разработка высокоуровневой платформы создания и эксплуатации веб-приложений	2010-218-02-302
45	Открытое акционерное общество «Московский радиозавод «Темп»	Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный институт электронной техники (технический университет)»	Разработка конструктивно-технологических принципов формирования и организация опытного производства многослойных конформных коммутационных плат (МККП) для авиационных и космических систем	2010-218-02-305
46	Открытое акционерное общество по переработке пластмасс «АЭЛИТА»	Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный морской технический университет»	Проведение совместных НИОКР и разработка энергоэффективных, автономных контейнерных энергоблоков теплоснабжения для удаленных районов Крайнего Севера, с использованием инновационных энергетических технологий, позволяющих на 30-50% снизить потребление горючего	2010-218-02-043

ФОРУМ

47	Закрытое акционерное общество «Нара»	Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования Московский автомобильно-дорожный институт (государственный технический университет)	Создание высокотехнологичного производства инновационных средств измерений и эталонов для их проверки в целях комплексного метрологического обеспечения учета нефти и продукции ее переработки на всех этапах движения от скважины до АЗС при реализации государственной автоматизированной информационной системы АИС «Нефтеконтроль»	2010-218-02-071
48	Закрытое акционерное общество «Р-Фарм»	Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Ярославский государственный педагогический университет им. К.Д. Ушинского»	Разработка технологий и организация производства импортозаменяющих активных фармацевтических субстанций	2010-218-02-163
49	Федеральное государственное унитарное предприятие «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов»	Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации	Организация высокотехнологичного производства и проведение испытаний интерферона бета – 1а человека, как жизненно необходимого и важнейшего лекарственного средства	2010-218-02-189
50	Общество с ограниченной ответственностью «Объединенная Компания РУСАЛ. Инженерно-технологический центр»	Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Сибирский федеральный университет»	Технология получения алюминиевых сплавов с редкоземельными, переходными металлами и высокоэффективного оборудования для производства электротехнической катанки	2010-218-02-194
51	Закрытое акционерное общество «ПСКОВЭЛЕКТРО-СВАР»	Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный технический университет им. Н.Э. Баумана»	Разработка инновационной высокопроизводительной технологии и промышленное освоение производства отечественного комплекса оборудования для комбинированной сварки и контроля качества сварных соединений газо- и нефтепроводов большого диаметра	2010-218-02-211
52	Открытое акционерное общество «Электромеханика»	Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Тверская государственная сельскохозяйственная академия»	Комплексный проект по созданию высокотехнологичного производства ресурсосберегающих и экологически безопасных холодильно-технологических комплексов для промышленного хранения и переработки пищевой продукции с использованием хладоносителя с фазовым переходом	2010-218-02-283
53	Закрытое акционерное общество «Фирма «АйТи». Информационные технологии».	Государственное образовательное бюджетное учреждение высшего профессионального образования «Государственный университет - Высшая школа экономики»	Создание высокотехнологичного производства кросс-платформенных систем обработки неструктурированной информации на основе свободного программного обеспечения для повышения эффективности управления инновационной деятельностью предприятия в современной России	2010-218-02-287
54	Закрытое акционерное общество «Инструменты нанотехнологии»	Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Южный федеральный университет»	Создание пилотной линии по производству зондовых датчиков и средств метрологического обеспечения зондовой нанодиагностики для нужд nanoиндустрии	2010-218-02-319
55	Закрытое акционерное общество «Нанотехнология МДТ»	Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»	Создание опытно-промышленного производства медицинского диагностического комплекса на базе атомно-силового микроскопа для диагностики инфекционных заболеваний на ранней стадии	2010-218-02-322

Международная экспертиза для супергрантов

Иван Стерлигов, STRF.ru

О тонкостях оценки заявок на гранты для приглашения ведущих ученых (постановление Правительства Российской Федерации от 9 апреля 2010 г. № 220 «О мерах по привлечению ведущих ученых в российские образовательные учреждения высшего профессионального образования») рассказывает Сергей Иванец, директор департамента международной интеграции Минобрнауки.

Принимают ли участие в оценке заявок на супергранты иностранные эксперты, как было обещано ранее?

– Да, конечно. Из порядка 900 отобранных экспертов больше половины – иностранцы, которых по нашей просьбе «предоставили» нам Американская ассоциация университетов, Ассоциация европейских университетов, Европейская комиссия, Ассоциация университетов и институтов высшего образования Германии, Ассоциация университетов Фландрии, Международное бюро Федерального министерства образования ФРГ, Американский благотворительный фонд поддержки информатизации образования и науки, Национальный научный фонд США и другие. Российских экспертов предложил, в основном, РФФИ.

Каждую заявку мы отправляем двум российским и двум зарубежным экспертам. Если по результатам оценки окажется, что мнения принципиально, кардинально разделились и несопоставимы, то заявку будут оценивать дополнительно другие эксперты. Экспертиза платная, в соответствии с общепринятой практикой, но я бы не сказал, что на нее уходят очень большие деньги.

Начата ли уже процедура оценки? Какой для нее отводится срок?

– Мы рассчитываем всю экспертизу завершить до конца октября. Большинство заявок уже разослано. Со стороны некоторых экспертов поступали просьбы увеличить срок, потому что у них сложный личный график. Но по тому, как идет экспертиза, мы видим, что большинство экспертов справляются со своей задачей за несколько дней.

Таким образом, в начале ноября у нас будут победители, которых определит совет по грантам.

Какова роль формальных показателей, в том числе характеризующих публикационную активность, число ссылок на статьи?

– Требование указать формальные параметры, характеризующие научное призвание, было в конкурсной документации. Экспертиза учитывает эти параметры в первую очередь. Вообще эксперт должен оценить заявку по целой группе вопросов. Они собраны в три блока: один характеризует ведущего ученого, как признанного в мире науки, второй – заявку, ее качество и предполагаемые результаты проекта, третий – вуз, его потенциал и способность воспринять и реализовать то, что заложено в заявке.

Разумеется, в оценке всех этих блоков важны и формальные, и неформальные параметры. Есть такие, с которыми не поспорить – например, индекс цитирования.

Все ли победители по естественным и точным наукам будут иметь высокий индекс Хирша и индекс цитирования?

– Здесь требуется пояснить роль совета по грантам при правительстве, который и будет принимать окончательное решение по победителям. Во всем мире при проведении конкурсов в области R&D комитеты либо руководители организаций, выделяющих деньги, в первую очередь учитывают результаты экспертизы, но принимают решение самостоятельно.

Именно из этих соображений в состав нашего совета вошли действительно авторитетные ученые, которые сами могут продемонстрировать самые высокие библиометрические показатели. Они обладают широкими знаниями, позволяющими оценивать все заявки, имеют возможность учитывать одну, другую, третью стороны вопроса. При этом экспертиза – это основа для их решения.

Заявки по общественно-гуманитарным областям тоже отсылаются иностранным экспертам? Нет никакой разницы в отношении дисциплин?

– Нет. Никаких квот и никакой дискриминации заявок по темам нет.

Но при этом по одним приоритетным дисциплинам заявки гораздо сильнее, чем по другим.



Сергей Иванец: «Среди заявителей у нас значительное число действительно очень хорошо известных и признанных в мире ученых».

Не получится ли, что некоторые научные направления останутся без победителей?

– Всего советом выделено 21 направление. Заявки принимались без ограничения. Вполне естественно, что они оказались распределены неравномерным образом по областям науки. Вместе с тем вводить заранее какие-то квоты не следует. Так можно потерять весь смысл приглашения ведущих и лучших ученых.

С другой стороны, если окажется, что все победители представляют одно направление, это тоже будет не очень правильно. Хотелось бы разнообразия. Но здесь решение будет не за министерством, а за советом по грантам, на то он и создан.

Среди участников, в том числе высокоцитируемых и признанных, есть люди весьма преклонных лет. Учитывается ли возраст при оценке заявки?

– Формальных ограничений по возрасту нет. Мы просто не имеем на это никаких основа-

ний. Конечно, желательно, чтобы было больше ведущих ученых – молодых одаренных ребят, ведь работа по созданию научной группы требует энергичного подхода. Вместе с тем – и, я думаю, любой согласится со мной, – некоторые ученые даже в преклонном возрасте могут дать много очков вперед молодежи.

Разумеется, эксперты, оценивая заявку, будут обращать внимание на возраст. Их задача – определить, насколько ты «ведущий» и по возрасту, и по активности. И у экспертов есть возможность проверить это, например, с помощью анализа публикаций в последние годы. Если человек в 90 лет выдает по несколько собственных статей в год, то, вероятно, нет оснований усомниться в его дееспособности.

Есть определенная категория участников, которые являются руководителями или заместителями руководителей крупных институтов и вузов. Бывает, что они подают заявку в соседний город, скажем, из Новосибирска

в Томск, или из Москвы в Тверь. Как Вы оцениваете участие в конкурсе со стороны таких людей?

– Есть формальное требование – ученый должен подать заявку на работу в другом субъекте федерации. Оно должно соблюдаться. Но есть и другое требование: начиная с 2011 года ученый должен проводить четыре месяца в году, непосредственно работая в вузе. Другими словами, работа ведущего ученого не должна быть «руководством по Скайпу».

Если ты директор или замдиректора организации, то, чтобы оставить рабочее место на несколько месяцев, ты должен решить формальные вопросы. У нас есть целый ряд подобных заявок. Думаю, что члены совета (если будут принимать решение в их пользу) потребуют некоторое формальное подтверждение возможности для руководителя такой организации на законном основании отсутствовать в ней установленное время. Это будет очень строго проверяться еще до присуждения грантов.

Сколько среди победителей будет «звезд»? Достаточно ли действительно ведущих мировых ученых среди заявителей?

– Могу ответить так: средний индекс Хирша не слишком велик – 17.5. Вместе с тем больше 70 человек имеют индекс выше 30. Другими словами, существенное количество принявших участие – это действительно ученые мирового уровня. Индекс цитирования 10 наиболее значимых работ заявителей в среднем составляет – 559. Но при этом почти 100 человек имеют индекс цитирования больше 1000, а у нескольких десятков он больше 2000.

Таким образом, среди заявителей у нас значительное число действительно очень хорошо известных и признанных в мире ученых. Другими словами, есть из кого выбирать. ●

УДК 571.27; 578.224

Толл-подобные рецепторы (TLR) и их значение в опухолевой прогрессии

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

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

*E-mail: ldenisy@yahoo.com

Поступила в редакцию 28.08.2010 г.

РЕФЕРАТ Толл-подобные рецепторы (TLR) являются главными компонентами системы врожденного иммунитета, которые опосредуют специфическое распознавание эволюционно консервативных молекулярных структур патогенов (PAMP – pathogen associated molecular patterns). Толл-подобные рецепторы представлены на клетках разного типа – от эпителиальных до иммунокомпетентных. Как известно, при связывании TLR с собственными лигандами происходит активация ряда адаптерных белков и киназ, которые участвуют в индукции ключевых провоспалительных факторов. Итогом такой индукции является развитие как врожденного иммунного ответа в результате усиления экспрессии ряда антиапоптотических белков, провоспалительных цитокинов, антибактериальных белков, так и приобретенного иммунного ответа через созревание дендритных клеток, презентации антигена и т.д. Благодаря своей способности усиливать специфические и неспецифические иммунные реакции организма агонисты Толл-подобных рецепторов нашли применение не только в терапии инфекционных заболеваний, но также в качестве адъювантов в химиотерапии различных злокачественных новообразований. Однако к настоящему моменту описаны принципиально различные эффекты TLR на опухоли. С одной стороны, показано, что TLR (и их лиганды) могут выступать в роли супрессоров опухолевого роста, с другой стороны, TLR могут стимулировать опухолевую прогрессию и влиять на устойчивость опухолей к химиотерапии. В представленном обзоре обобщены данные о влиянии TLR и их агонистов на рост опухоли, а также проанализированы основные механизмы, лежащие в основе таких различий.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА Толл-подобные рецепторы, агонисты рецепторов врожденного иммунитета, опухоль, врожденный иммунный ответ, воспаление.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ TLR – Толл-подобные рецепторы; ЛПС – липополисахарид; NF-κB – ядерный фактор транскрипции κB; PRR – паттерн-распознающие рецепторы; PAMP – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны; DAMP – молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением; IRF – интерферонрегулирующий фактор, оц- и дцРНК – одно- и двухцепочечная рибонуклеиновая кислота; TNF-α – фактор некроза опухоли α; IL – интерлейкин; IFN – интерферон; НК-клетки – естественные киллеры; миРНК – малые интерферирующие РНК; TGF – трансформирующий фактор роста.

ВВЕДЕНИЕ

По современным представлениям воспаление является одной из главных причин возникновения и прогрессии опухолевых заболеваний [1, 2]. Механизм этой взаимосвязи изучен недостаточно полно, но уже сегодня понятен ряд ключевых событий, происходящих в очаге воспаления и необходимых для возникновения и прогрессии опухоли.

1) В клетках, находящихся в очаге воспаления, поддерживается стабильно высокая активность транскрипционного фактора NF-κB [3], ответственного за экспрессию провоспалительных цитокинов, многие из которых (GROα,β,γ, IL-8, MIP-3α) обладают опухолестимулирующим действием [4, 5]. Более того, NF-κB считается основным антиапоптоти-

ческим фактором, активирующим экспрессию генов ряда антиапоптотических белков, таких, как IAP, Bcl-2, Bcl-X_L и др. Присутствие этих белков увеличивает устойчивость клеток к различным стрессовым воздействиям, возникающим в ходе развития воспаления [6, 7].

2) Процесс воспаления сопровождается индукцией окислительного стресса – причине появления и накопления мутаций, а также генетических перестроек в клетках [8].

3) На завершающих этапах воспаления секретруется большое количество провоспалительных цитокинов (GROα/CXCL1, GROβ/CXCL2, GROγ/CXCL3 и IL-8/CXCL8, MIP-3α, IL-1) и факторов роста (TGF-β1, PDGF, bFGF, TGF-α, IGF-I, IGF-II), ко-

торые усиливают миграцию в очаг воспаления клеток стромы (фибробластов) и эпителиальных клеток, а также их последующую пролиферацию [9]. При хроническом воспалении процессы репарации и альтерации зачастую происходят одновременно, что заставляет клетки пролиферировать в условиях гипоксии и генотоксического стресса, повышая тем самым риск возникновения мутаций.

Наиболее частой и хорошо изученной причиной развития воспаления является микробная инвазия, в ходе которой патоген способен различными способами нарушать гомеостаз клетки хозяина.

Один из таких механизмов – взаимодействие высококонсервативных участков молекул патогена с эукариотической клеткой через паттерн-распознающие рецепторы (PRR – RIG-I-подобные рецепторы, Nod-подобные рецепторы, лектины С-типа, Толл-подобные рецепторы (TLR) и др.), расположенные на поверхности и/или внутри эукариотических клеток [10].

Связывая различные бактериальные лиганды, PRR играют ключевую роль в развитии воспаления, инициируя развитие как врожденного иммунного ответа (усиливают экспрессию ряда антиапоптотических белков, провоспалительных цитокинов, антибактериальных белков), так и приобретенного (индуцируют созревание дендритных клеток, презентацию захваченного антигена, дифференцировку наивных Т-хелперов) [11].

В связи с этим становится актуальным изучение роли PRR в индукции опухолеобразования и стимуляции опухолевой прогрессии при развитии бактериальной инфекции.

В данном обзоре мы остановим внимание на роли TLR в развитии воспалительных реакций и попытаемся оценить их взаимосвязь с опухолевой прогрессией.

Сегодня накоплены данные, свидетельствующие о том, что TLR ассоциированы с опухолевым ростом. Однако к настоящему моменту опубликованы противоречивые данные, подтверждающие как опухолестимулирующее [12, 13], так и опухолесупрессирующее действие TLR [14, 15].

В связи с этим целью нашего обзора является систематизация имеющихся данных и описание возможных механизмов, обуславливающих различия в проявляемых эффектах TLR на рост опухоли.

ФУНКЦИЯ TLR

TLR по выполняемым в организме функциям относят к семейству PRR, которые опосредуют специфическое распознавание эволюционно консервативных структур патогенов (PAMP – pathogen associated molecular patterns). Связываясь с PAMP, TLR активируют систему врожденного иммунитета и во многом определяют развитие адаптивного иммунитета [16,

17]. Наиболее консервативная роль TLR – активация антимикробного иммунитета в коже, слизистых оболочках респираторного, гастроинтестинального и урогенитального тракта.

TLR распознают микробные молекулы, что приводит к развитию воспалительных реакций, вызванных активацией фактора NF- κ B, который регулирует экспрессию провоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-1, IL-6 и др.) и хемокинов (MCP-1, MCP-3, GM-CSF и др.).

TLR вовлечены в транскрипционную и посттрансляционную регуляцию (протеолитическое расщепление и секрецию) таких антимикробных факторов, как дефензины (α и β), фосфолипаза A2, лизоцим и др. [18]. TLR усиливают поглощение микроорганизмов фагоцитами и оптимизируют их инактивацию, регулируя выброс перекисных радикалов и оксида азота [19, 20].

Известно, что TLR, находящиеся на поверхности эндотелиальных клеток, опосредованно обеспечивают миграцию лейкоцитов в очаг воспаления, стимулируя экспрессию молекул адгезии лейкоцитов – E-селектина и ICAM-1 [21].

Стимуляция TLR прямо ведет к увеличению продукции интерферонов (IFN)- α/β как стромальными, так и гемопоэтическими клетками, что важно для защиты организма от вирусных и некоторых бактериальных инфекций [22]. Более того, недавно было установлено, что TLR, активируя ряд молекул (FADD, каспаза 8, протеинкиназа R (PKR)) или стимулируя экспрессию IFN- α/β , могут индуцировать развитие апоптоза – важного механизма, защищающего клетки от патогенных микроорганизмов [23].

Показано, что TLR играют центральную роль в регуляции адаптивного иммунного ответа. Так, TLR-зависимая активация профессиональных антигенпредставляющих дендритных клеток является определяющим моментом в нескольких принципиальных для развития адаптивного иммунитета процессах: активации зрелых Т-клеток; процессинга и презентации микробных антигенов; повышении экспрессии костимуляторных молекул (CD80, CD86), необходимых для активации наивных CD4+ Т-клеток; подавлении регуляторных Т-клеток посредством продукции IL-6 [24]. Также известно, что TLR-зависимая активация важна для пролиферации и созревания В-клеток во время инфекции [25].

Таким образом, TLR выполняют в организме важную роль, которая заключается в развитии воспалительных реакций (активации врожденного иммунитета) в ответ на попадание в организм самых различных патогенов (простейших, грибов, бактерий, вирусов). Более того, по современным представлениям распознавание патогенов посредством TLR является ключевым моментом в формировании второй

линии защиты – адаптивного иммунитета [11]. Также показано, что TLR принимают участие в нормальном функционировании кишечника, они вовлечены в развитие аутоиммунных заболеваний (системная волчанка), артритов, атеросклероза и др. [26, 27]. В последнее время получены данные, которые показывают, что TLR способны активировать противоопухолевый иммунитет [28, 29] или, наоборот, стимулировать опухолевую прогрессию [30, 31].

СТРУКТУРА TLR, ИХ ЭКСПРЕССИЯ РАЗЛИЧНЫМИ ТИПАМИ КЛЕТОК, СПЕЦИФИЧНОСТЬ ПО ОТНОШЕНИЮ К РАЗЛИЧНЫМ МОЛЕКУЛЯРНЫМ СТРУКТУРАМ (PAMP И DAMP)

По своей структурной организации TLR относятся к семейству рецепторов IL-1 (IL-1R). TLR – это трансмембранные белки, которые экспрессируются на поверхности клетки и в субклеточных компартментах (таких, как эндосомы). Локализация TLR связана с типом распознаваемого им лиганда. Так, TLR 1, 2, 4, 5, 6, связывающие структурные бактериальные компоненты, локализуются на поверхности клеток, тогда как TLR 3, 7, 8, 9, распознающие преимущественно вирус-ассоциированные структуры – нуклеиновые кислоты (дцРНК, оцРНК, ДНК), находятся в эндосомах, где взаимодействуют с лигандами после депротенизации вирионов [16].

В структуре TLR выделяют N-концевой лейцин-богатый (LRR) домен, ответственный за связывание лигандов, трансмембранный домен и C-концевой внутриклеточный сигнальный домен (гомологичный внутриклеточному домену IL-1R) [32].

TLR экспрессируются в большинстве типов клеток организма человека, включая негемопоэтические эпителиальные и эндотелиальные клетки. Количество одновременно экспрессируемых TLR и их сочетание специфичны для каждого типа клеток,

а больше всего TLR в клетках гемопоэтического происхождения, таких, как макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки (табл. 1) [33].

В настоящий момент у млекопитающих идентифицировано 13 различных TLR, у человека – 10 и 12 у мышей. TLR с 1-го по 9-й консервативны у человека и мыши. Однако существуют и различия. Ген, кодирующий TLR10, обнаружен только у человека, а TLR11 – у обоих видов, но функционален только у мышей [34].

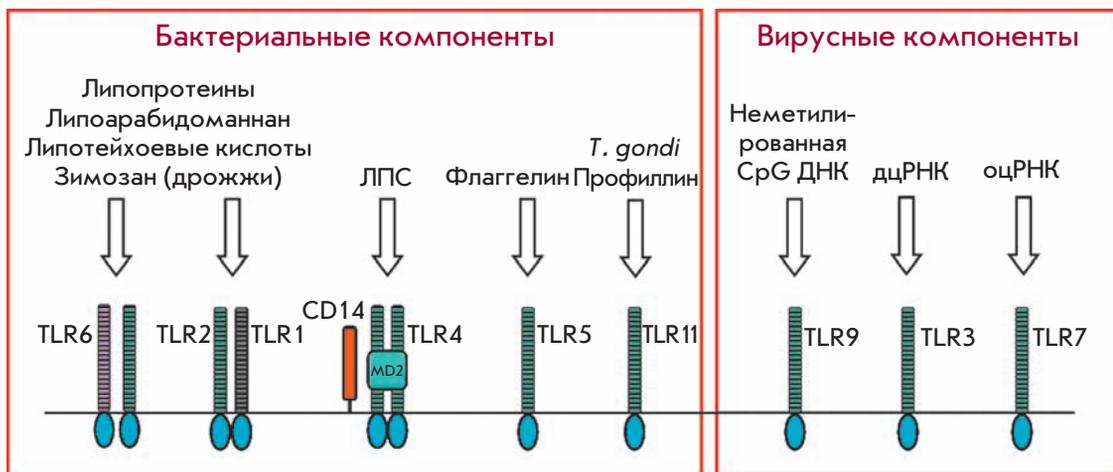
Главная особенность TLR, отличающая их от рецепторов приобретенного иммунитета (Т- и В-клеточные рецепторы), состоит в их способности распознавать не уникальные эпитопы, а эволюционно консервативные патоген-ассоциированные молекулярные структуры (PAMP), широко представленные у всех классов микроорганизмов и вирусов независимо от их патогенности.

Специфичность распознавания PAMP достаточно хорошо изучена у большинства TLR, сегодня известны лиганды TLR 1–9 и 11 (рис. 1). Биологическая роль и специфичность TLR10 (человек), 12 и 13 (мышь) остаются неизвестными [16].

Наиболее известные микробные лиганды TLR:

- бактериальные липопептиды, липотейхоевая кислота и пептидогликаны; липоарабидоманнан микобактерий; компонент клеточной стенки грибов зимозан, которые связываются с TLR2, образующим гетеродимеры с TLR1, TLR6 и CD14;
- ЛПС грамотрицательных бактерий, лиганд TLR4;
- компонент жгутиков бактерий – флагеллин, активирующий TLR5;
- профиллин-подобные структуры простейших, связывающиеся с TLR11;
- ДНК (неметилированные CpG-последовательности), распознаваемая TLR9;
- дцРНК – лиганд TLR3;
- оцРНК – лиганды TLR7 и TLR8.

Рис. 1. Толл-подобные рецепторы и их лиганды.



Недавно было показано, что TLR могут активироваться многими эндогенными молекулами – алларминами (гиалуроновая кислота, белки теплового шока и др.), которые появляются при разрушении тканей. Эти гетерогенные по своей природе и структуре соединения (PAMP и аллармины), распознаваемые TLR, в настоящее время объединяют в одно семейство, именуемое DAMP (damage associated molecular patterns) [35].

КАСКАД СИГНАЛОВ, АКТИВИРУЮЩИЙСЯ ПОСЛЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ TLR С СОБСТВЕННЫМИ ЛИГАНДАМИ

Теперь от описания структуры и функций TLR перейдем к событиям, разворачивающимся после их связывания с собственными лигандами.

Связывание лиганда с TLR инициирует каскад сигналов, берущих начало от цитоплазматических TIR-доменов TLR. Сигнал от TIR-домена через адаптерные молекулы MyD88 (myeloid differentiation factor 88), TIRAP (TIR-доменсодержащие адаптеры), TICAM1 (TRIF), TICAM2 (TIR-containing adapter molecule) передается на соответствующие киназы (TAK, IKK, TBK, MAPK, JNKs, p38, ERK, Akt и др.), которые дифференциально активируют факторы транскрипции (NF-κB, AP-1 и IRF), ответственные за экспрессию различных провоспалительных и антимикробных факторов. При этом все TLR, кроме TLR3, передают сигнал на киназы, используя MyD88. TLR3 передает сигнал через TICAM1, а TLR4 и через MyD88, и через TICAM1 (рис. 2).

Активация того или иного фактора определяется типом TLR, от которого передается сигнал. Так, практически все TLR (TLR2 и его корецепторы – TLR1 и TLR6, а также TLR4–9, TLR11), связываясь с собственными лигандами, способны активировать NF-κB – один из основных факторов, регулирующих экспрессию таких провоспалительных цитокинов, как IL-1, -6, -8 и др. К активации другого семейства провоспалительных транскрипционных факторов – IRF приводит передача сигнала через TLR3, 4, 7–9. Сигналы, передаваемые через TLR3 или TLR4, ведут к активации IRF3, который регулирует экспрессию IFN-β и считается критическим компонентом противовирусных иммунных реакций. Передача сигналов посредством TLR7–9 ведет к активации IRF5 и IRF7 и экспрессии IFN-α, который также играет жизненно важную роль в противовирусной защите. Сигнализация через TLR2 или TLR5 не ведет к активации факторов семейства IRF [36].

Таким образом, взаимодействие TLR определенно-го типа с собственным лигандом инициирует запуск сигнального каскада, который приводит к активации

Таблица 1. Активация транскрипционных факторов NF-κB и IRF различными TLR

Тип TLR	Активация NF-κB	Активация IRF
TLR2/1/6	+	-
TLR3	+	+ (IRF3)
TLR4	+	+ (IRF3)
TLR5	+	-
TLR7	+	+ (IRF5, 7)
TLR8	+	+ (IRF5, 7)
TLR9	+	+ (IRF5, 7)

экспрессии специфического сочетания генов (цитокинов, антимикробных молекул и т.д.).

Однако в настоящее время многое в активации TLR-зависимых сигнальных путей и в развитии последующих эффектов остается непонятным. В доступной научной литературе отсутствуют данные, характеризующие полные транскриптомные и протеомные изменения, которые происходят в ответ на активацию определенных TLR.

TLR И ОПУХОЛИ

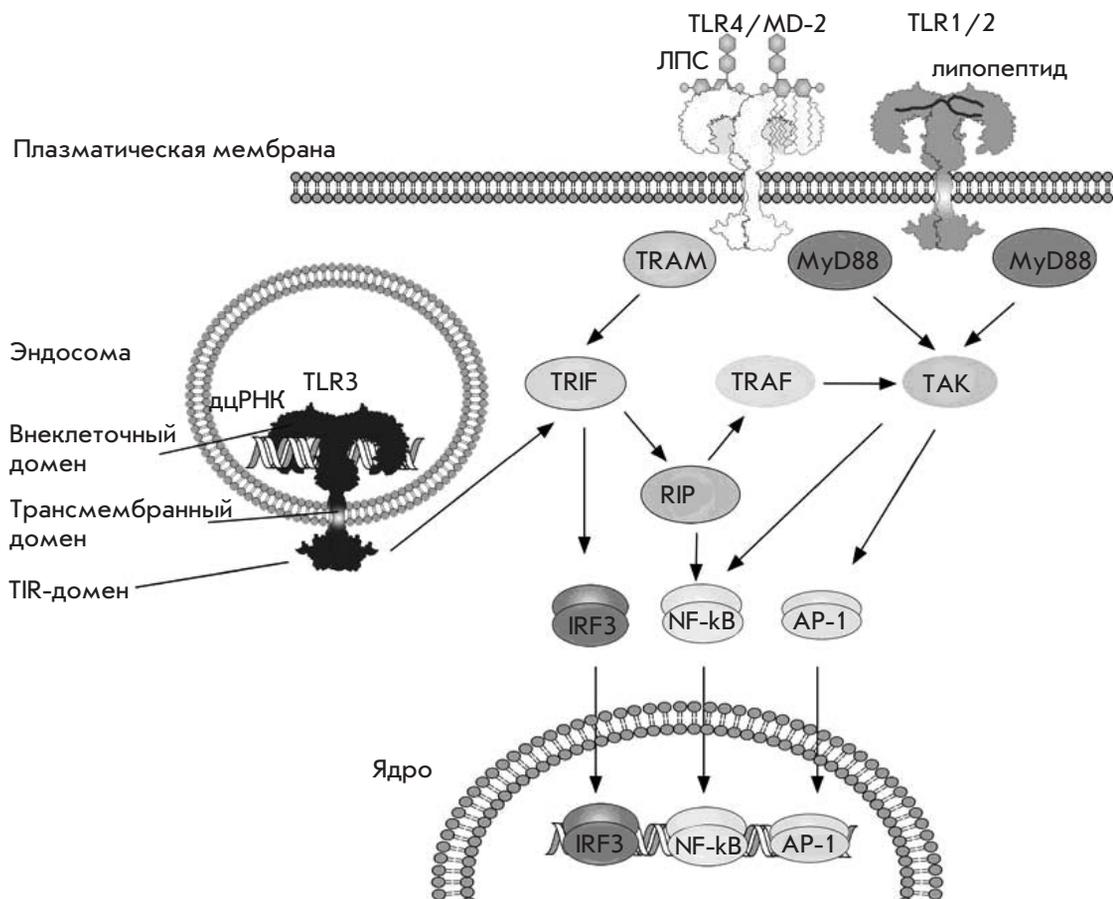
К настоящему моменту описаны принципиально различные эффекты TLR на опухоли. С одной стороны, показано, что TLR (и их лиганды) могут выступать в роли супрессоров опухолевого роста, с другой, известно, что TLR могут стимулировать опухолевую прогрессию и влиять на устойчивость опухолей к химиотерапии. Чтобы объяснить эти противоречия, рассмотрим детально каждый из случаев.

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ TLR

Многие агонисты TLR в настоящее время проходят клинические испытания в качестве противоопухолевых средств (табл. 2). Так, природные (оцРНК) и синтетические (имиквимод) агонисты TLR7 и 8 показали высокую активность в отношении хронического лимфоцитарного лейкоза и опухолей кожи [37]. Лиганд TLR9 – CpG, способен подавлять рост лимфом, опухолей головного мозга, почек, кожи [28]. А лиганд TLR3 – poly(IC) обладает проапоптотическим действием не только в отношении опухолевых клеток, но и клеток окружения (например, эндотелия) [38].

Показано, что агонисты TLR4 – ЛПС грамотрицательных бактерий и ОК-432 (препарат из стрептококков группы А), обладают высокой противоопухолевой активностью при внутриопухолевом введении. Однако при системном введении оба препарата (ЛПС и ОК-432) не обладали способностью блокировать опухолевый рост [39]. В настоящее время препарат ОК-432 проходит вторую стадию клинических испытаний, в качестве средства против колоректальных опухолей

Рис. 2. Сигнальные пути, идущие от Толл-подобных рецепторов.



и рака легкого. Также показано, что ОМ-174, химический агонист TLR2/4, способен подавлять прогрессию меланомы и повышать выживаемость экспериментальных животных при совместном введении с циклофосфамидом [40]. В этих экспериментах обнаружено, что агонисты TLR2/4 индуцируют секрецию TNF-α и экспрессию индуцибельной NO-синтазы. Как известно, NO способен индуцировать апоптоз в опухолевых клетках, устойчивых к химиотерапии, и тем самым повышать продолжительность жизни мышей. Еще один известный противоопухолевый препарат микробного происхождения, активирующий TLR-зависимые реакции (TLR2, 4, 9), – БЦЖ. Этот препарат уже более 30 лет относительно успешно применяется в терапии опухолей мочевого пузыря [41].

В целом, необходимо отметить, что в настоящее время различные агонисты TLR проходят клинические испытания как средства против опухолей различного происхождения (табл. 2).

Один из основных механизмов противоопухолевой активности TLR состоит в их способности стимулировать развитие опухолеспецифического иммунного ответа. Так, активация TLR:

1) стимулирует (прямо или опосредованно) миграцию в опухоль NK-клеток, цитотоксических Т-клеток и Т-хелперов I-го типа, которые вызывают лизис опухолевых клеток при помощи различных эффекторных механизмов (секреция перфоринов, гранзимов, IFN-γ и др.) [42];

2) приводит к секреции IFN I типа (IFN-α, β) [43].

Таблица 2. TLR в клинических исследованиях

Злокачественное образование	TLR
Немелкоклеточный рак легкого поздней стадии	TLR9
Меланома IV стадии	TLR7
Меланома IIIb/c, или IV стадии	TLR9
Неполностью операбельный рак поджелудочной железы	TLR2/6
Рецидив неходжкинской лимфомы	TLR9
Рецидив глиобластомы	TLR9
Хронический лимфобластный лейкоз	TLR7

Таблица 3. Влияние TLR на развитие и рост опухоли

Опухолестимулирующая активность	TLR	Противоопухолевая активность	TLR
Стимуляция ангиогенеза	2, 9	Подавление ангиогенеза	7, 9
Стимуляция пролиферации	3, 4	Развитие апоптоза	3, 4, 7, 9
Химиорезистентность	4	Повышение химиочувствительности	2, 4, 7
Активация регуляторных Т-клеток (Treg)	4, 5	Ингибирование Treg, презентация антигена	4, 5, 7, 8, 9
		Цитотоксичность	9

Еще один вероятный механизм противоопухолевой активности TLR – возможность TLR-зависимого перехода опухолестимулирующего типа макрофагов (M2) в опухолесупрессирующий тип M1. Макрофаги типа M2 характеризуются экспрессией таких цитокинов, как TGF- β и IL-10, компонентов, необходимых для репарации и ремоделирования тканей. TGF- β стимулирует пролиферацию опухолевых клеток, IL-10 направляет развитие иммунного ответа в сторону Th2, блокируя тем самым развитие клеточного противоопухолевого иммунитета. Макрофаги типа M1, напротив, экспрессируют IL-1, -6, -12, TNF- α , IFN- γ и стимулируют развитие противоопухолевого клеточного (Th1) иммунного ответа [44].

ОПУХОЛЕСТИМУЛИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ TLR

Как известно, хронические инфекции и воспаление являются важнейшими факторами, стимулирующими развитие злокачественных новообразований. В частности, рак желудка может быть связан с хроническим воспалением, вызванным таким патогеном, как *Helicobacter pylori*, а хроническое воспаление пищеварительного тракта часто ассоциировано с развитием рака толстой кишки [45]. Более того, показано, что применение нестероидных противовоспалительных препаратов может снижать риск развития некоторых типов злокачественных новообразований [46].

TLR служат ключевым звеном системы врожденного иммунитета человека и животных, они участвуют в развитии воспалительных реакций при контакте клеток с различными патогенами. В настоящее время активно изучается роль TLR в развитии и прогрессии опухолей различного происхождения. TLR могут быть вовлечены в процесс развития и стимуляции опухолеобразования посредством нескольких механизмов (табл. 3).

Один из важнейших факторов, обуславливающих взаимосвязь хронического воспаления и опухолеобразования – NF- κ B [47]. Этот фактор конститутивно активирован более чем в 90% опухолей человека, включая острый и хронический миелоидный лейкоз, рак предстательной железы, множественную миелому, злокачественную гепатому (рак печени) и т.д. [48,

49]. В связи с этим агенты, способные активировать NF- κ B, могут непосредственно участвовать в процессе развития и прогрессии опухоли. Как известно, взаимодействие патогенов с TLR на поверхности клетки приводит к активации NF- κ B и экспрессии NF- κ B-зависимых генов, что и обуславливает участие TLR в стимуляции канцерогенеза. Активация NF- κ B приводит к повышению продукции цитокинов IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, TNF- α ; миграции клеток иммунной системы к месту воспаления в результате повышения продукции хемокинов; «поддержанию» хронического воспаления; повышению продукции антиапоптотических факторов и т.д. Указанные свойства могут обеспечивать выживаемость и прогрессию опухоли за счет подавления апоптоза и цитотоксичности, а также индукции ангиогенеза [50].

В настоящее время известно, что уровень TLR повышен в клетках различных опухолей, и у мышей с нокаутом генов TLR снижена частота образования индуцируемых опухолей [67]. Более того, повышение экспрессии TLR на поверхности клеток опухоли предстательной железы или опухоли головы и шеи может стимулировать их пролиферацию [51].

Huang и соавт. [31] показали, что *Listeria monocytogenes* обладает прямым опухолестимулирующим действием, связанным с ее способностью активировать TLR2-зависимые сигнальные пути в клетках рака яичника. Более того, TLR2-зависимая активация NF- κ B, вызванная *L. monocytogenes*, приводила к повышению устойчивости опухолевых клеток к действию химиотерапевтических препаратов [31]. Взаимосвязь TLR2 с опухолевой прогрессией подтверждена в еще одном независимом исследовании, в котором Karin и соавт. [67] доказали ключевую роль этого рецептора в метастазировании рака легкого. Оказалось, что у мышей с нокаутом гена TLR2 метастазирование и прогрессия опухолей происходит значительно медленнее, чем у мышей дикого типа. Ключевую роль в прогрессии рака легкого играли миелоидные клетки, экспрессирующие TNF- α в ответ на их стимуляцию версиканом (протеогликаном внеклеточного матрикса, лиганда TLR2, уровень которого повышен в опухолевых клетках многих ти-

пов). В наших исследованиях также изучали роль TLR2 в опухолевой прогрессии. В частности, оказалось, что микоплазменная инфекция (*Mycoplasma arginini*) или добавление структурных компонентов (ЛАМБ) этого возбудителя к клеткам, экспрессирующим TLR2, приводит к подавлению в них апоптоза, а также к усилению опухолевого роста в условиях *in vivo* [52, 53]. Таким образом показано, что TLR могут оказывать опосредованный опухолестимулирующий эффект через клетки миелоидного ряда [54].

Сходные данные получены и для другого представителя семейства TLR – TLR4. Системное (внутривенное) введение лиганда этого рецептора – ЛПС, стимулировало миграцию опухолевых клеток (аденокарцинома молочной железы) и повышало их инвазивность, а также стимулировало ангиогенез в опухолях [30]. Аналогичные результаты получены на другой модели – аденокарциноме кишечника: ЛПС увеличивал выживаемость клеток опухоли, стимулировал их пролиферацию, а при интраперитонеальном введении усиливал метастазирование [55]. Более того, Huang и соавт. показали, что опухолевые клетки, экспрессирующие TLR4, вызывают значительно более агрессивное течение заболевания (сокращение времени жизни животных) по сравнению с мышами изогенной линии, у которых TLR4 инактивирован специфической мiРНК. Полученные данные позволили предположить, что на прогрессию TLR4-позитивных опухолей могут влиять эндогенные лиганды (белки теплового шока; β -дефензины; эндогенный ЛПС, забрасываемый из кишечника), что отчасти напоминает ситуацию с опухолестимулирующим действием TLR2 и его лигандом эндогенного происхождения – версиканом [56].

Однако данные, иллюстрирующие опухолестимулирующее действие TLR, получены не только для TLR2 и 4. Известно, что повышенная экспрессия TLR5 и TLR9 на клетках эпителия шейки матки может быть ассоциирована с прогрессией рака шейки матки [57]. Высокий уровень экспрессии TLR9 обнаружен в клинических образцах рака легкого и в линиях опухолевых клеток. В этих клетках стимуляция TLR9 специфическими агонистами приводила к повышению продукции опухоль-ассоциированных цитокинов [58]. На поверхности клеток опухоли предстательной железы человека также повышен уровень TLR9 [59]. Обработка таких клеток CpG-олигодезоксинуклеотидами (ODN-CpG) или бактериальной ДНК, служащих лигандами для TLR9, способствовала повышению инвазии опухолевых клеток. Повышение инвазии опухолевых клеток в результате активации TLR9 можно рассматривать как новый механизм, посредством которого хронические инфекции могут стимулировать рост клеток опухоли предстательной железы.

Однако способностью стимулировать канцерогенез через взаимодействие с TLR обладают не только различные инфекционные агенты и их структурные компоненты. Как известно, лигандами для TLR служат также DAMP – ядерные и цитоплазматические белки клеток, подвергшихся некрозу. Высвобождаемые из поврежденных клеток DAMP могут распознаваться различными TLR на поверхности иммунных клеток, а последующая активация TLR-зависимых сигналов способна приводить к подавлению противоопухолевого иммунного ответа и, как следствие, к стимуляции прогрессии опухоли [60].

К таким молекулам, обладающим потенциальным опухолестимулирующим действием, относятся: белки теплового шока (HSP60, 70), АТФ и мочевиная кислота, семейство Ca^{2+} -модулирующих белков (S100), белок HMGB1 и нуклеиновые кислоты, из которых наиболее хорошо изучен ДНК-связывающий белок HMGB1. Высвобождаемый в результате повреждения клеток белок HMGB1 активирует иммунную систему через взаимодействие с TLR. На культурах клеток показано, что белок HMGB1 стимулирует рост клеток меланомы, рака молочной железы, толстой кишки, поджелудочной и предстательной железы. HMGB1 способен активировать TLR2 и TLR4 на опухолевых клетках и клетках иммунной системы и, как следствие, индуцировать опухолевую прогрессию и метастазирование [61].

Показано, что в клетках меланомы повышена экспрессия таких DAMP, как белки семейства S100, способные стимулировать рост и самих клеток меланомы, и лимфоцитов периферической крови, действуя как аутокринный фактор роста опухоли. Белок S100A4, служащий лигандом для TLR, стимулирует метастазирование клеток рака молочной железы, а его повышенная экспрессия является показателем плохого прогноза. Несмотря на взаимосвязь S100A4 с метастазированием, этот белок может экспрессироваться макрофагами, лимфоцитами и фибробластами. Недавние исследования показали, что белки S100A8 и S100A9, продуцируемые первичной опухолью, способны активировать сывороточный амилоид А (SAA) 3 в легочных тканях и создавать тем самым условия для образования метастатической ниши. SAA3 служит лигандом для TLR4 на эндотелиальных клетках легкого и макрофагах. Активация TLR4 облегчает миграцию опухолевых клеток из первичного очага в ткань легкого за счет формирования микроокружения, способствующего росту опухоли. Таким образом, подавление сигнального пути S100–TLR4 может эффективно противодействовать образованию метастазов в легком [62].

Суммируя описанные эффекты, можно сделать вывод о способности TLR, с одной стороны, прямо или опосредованно участвовать в опухолевой про-

грессии, а с другой – повышать устойчивость опухолевых клеток к проапоптотическим воздействиям.

Представленные данные показывают, что опухолестимулирующие эффекты TLR и их лигандов имеют сложный механизм, который необходимо изучать более детально. Однако, несмотря на сложность данного вопроса, можно выделить несколько ключевых моментов, определяющих опухолестимулирующее действие TLR:

1) взаимодействие TLR с собственными лигандами индуцирует активацию транскрипционного фактора NF- κ B и, как следствие, повышение продукции различных провоспалительных цитокинов (IL-6, MCP-1, MIF, GRO α и др.), а также ряда антиапоптотических белков, тем самым способствуя прямому или опосредованному опухолестимулирующему действию;

2) TLR-зависимая активация миелоидных клеток и их предшественников, по-видимому, является определяющим фактором в формировании метастазов. В серии независимых работ показано, что миелоидные клетки, мигрирующие из костного мозга (в ответ на эндогенную стимуляцию) в ткани, играют ключевую роль в формировании метастатических ниш [30, 54]. Поскольку известно, что эндогенные (версикан, фибронектин и др.) и экзогенные (микробного происхождения) лиганды TLR способны, с одной стороны, стимулировать миелоидные клетки и их предшественники, а с другой – увеличивать метастатический потенциал опухоли, то можно с высокой вероятностью предположить существование взаимосвязи между TLR-зависимой активацией миелоидных клеток и их последующим участием в метастазировании;

3) активация TLR может стимулировать ангиогенез через такие ангиогенные факторы, как IL-8, фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF) и матриксные металлопротеиназы (ММР), а также усиливать адгезивные и инвазивные свойства опухолевых клеток наряду с увеличением проницаемости сосудов.

ТОЛЛ-ПОДОБНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ В ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ

Благодаря способности агонистов TLR индуцировать противоопухолевый иммунный ответ путем регуляции функции клеток иммунной системы, находящихся в микроокружении опухоли, перспективной представляется противоопухолевая терапия, основанная на доставке лигандов TLR в очаги роста опухоли. Примером такой терапии может стать препарат имиквимод, содержащий агонист TLR7. Этот препарат используется при актиническом кератозе и базальноклеточной карциноме. Изучается также возможность использования этого препарата в качестве адъюванта в терапии мелано-

мы [63, 64]. Еще один агонист TLR7, используемый в терапии опухолей, – препарат 852A. В настоящее время рассматривается возможность использования препарата 852A в терапии хронического лимфоидного лейкоза и других солидных опухолей [65]. Агонист TLR9 – ODN-CpG, индуцирует активацию и созревание дендритных клеток, стимулирует развитие Т-клеточного противоопухолевого ответа. В настоящее время проводятся клинические испытания безопасности и эффективности агонистов TLR9 в терапии рака молочной железы, толстой кишки, легкого, меланомы, глиобластомы и др. [28]. Макрофаг-активирующий липопептид-2 (MALP-2), агонист TLR2/6, показал обнадеживающие результаты в терапии рака поджелудочной железы: внутриопухолевое введение MALP-2 совместно с гемцитабином во время лапоротомии значительно повышало продолжительность жизни больных с неполовностью операбельным раком (от 9 до 17 месяцев) [66]. Описанные примеры эффективного использования агонистов TLR в терапии опухолей показывают перспективность использования этих препаратов, а также целесообразность дальнейших исследований, направленных на создание противоопухолевых препаратов с аналогичным механизмом действия.

Однако, как сказано ранее в этом обзоре, большое количество опухолевых клеток могут экспрессировать TLR на своей поверхности, и прямое взаимодействие таких клеток с лигандами к TLR может усиливать прогрессию опухоли, а также делать ее менее чувствительной к химиотерапевтическим препаратам. Таким образом, существует вероятность того, что постоянно циркулирующие в организме агонисты TLR (патогенные микроорганизмы, способные преодолеть иммунный барьер; ЛПС бактерий, входящих в состав нормальной микрофлоры кишечника, который может забрасываться в кровоток; собственные эндогенные лиганды) могут прямо или опосредованно способствовать усилению опухолевой прогрессии.

В связи с этим перспективное направление в терапии злокачественных новообразований состоит в использовании подходов, ориентированных на подавление TLR-зависимых сигнальных путей. В качестве уже известных подходов, применяемых в терапии злокачественных новообразований, можно выделить использование ингибиторов NF- κ B.

Как известно, конститутивная активация этого фактора наблюдается в таких типах опухолей, как: болезнь Ходжкина, острый лимфобластный лейкоз, множественная миелома, рак молочной железы, толстой кишки, легкого, яичников, предстательной железы, различные виды лимфом, рак печени, меланомы и др. [48, 49].

Для подавления активности NF- κ B используются несколько групп лекарственных средств: нестероидные противовоспалительные средства, ингибирующие активность ИКК и СОХ-2; природные и биодоступные ингибиторы ИКК β – флавоноиды, простагландины, BMS-345541, PS1145, SC-514 и SPC839; а также ингибиторы протеасом, подавляющие активность NF- κ B за счет предотвращения деградации I κ B – бортезомиб (PS-341), иринотекан, гемцитабин и др. препараты, широко используемые в терапии опухолей толстого и тонкого кишечника, желудка, поджелудочной железы и др. [67]

Поскольку фактор NF- κ B является ключевым звеном TLR-зависимого сигнального пути, то использование его ингибиторов представляется перспективным для подавления TLR-зависимой стимуляции опухолевого роста.

Другой перспективной мишенью, по нашему мнению, могут быть сами TLR. Поскольку TLR2 и TLR4 (рецепторы, участвующие в стимуляции опухолевого роста) экспрессируются на поверхности клетки, представляется возможным использовать специфические молекулы (антитела, химические ингибиторы), подавляющие их функциональную активность. К настоящему моменту получены антитела, блокирующие активность TLR, однако данные по их клиническому использованию в доступной научной литературе отсутствуют.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

TLR входят в состав семейства PRR. Эффекты, связанные с их активацией, выходят за рамки реакций врожденного иммунного ответа. Участие в активации дендритных клеток, регуляции специфических иммунных реакций на уровне Т- и В-клеток, повышение экспрессии IFN и др. обуславливают вовлечение TLR в формирование эффективного ответа врожденной и адаптивной иммунной системы при попадании в организм различных патогенов или при поддержании тканевого гомеостаза. Опубликованы результаты многочисленных исследований, согласно которым лиганды к TLR могут использоваться в качестве адъювантов для иммунотерапии злокачественных новообразований. Однако известно, что активация TLR на поверхности опухолевых клеток может приводить к усилению прогрессии опухолей различного происхождения.

Такое различие в эффектах зависит, в первую очередь, от типа используемого лиганда. Как показано в *табл. 1*, TLR можно разделить на две группы: индуцирующие и неиндуцирующие выработку IFN. Как правило, при введении агонистов TLR3, 4, 7, 8, 9, активирующих IRF, наблюдается подавление роста опухоли. В то же время данные о противоопу-

холевом действии агонистов TLR2, который в отличие от перечисленных рецепторов (TLR3, 4, 7, 8, 9) не способен активировать выработку IFN I типа, в настоящее время отсутствуют. Еще одна характерная особенность, обуславливающая различия в действии агонистов TLR на опухоль, – это способ их введения. Внутритропуховое введение лигандов TLR3, 4, 7, 8, 9 в подавляющем большинстве случаев вызывает гибель клеток опухоли и уменьшение ее размеров. Наиболее вероятное объяснение противоопухолевой активности этих TLR заключается в их способности в ответ на взаимодействие с лигандом: а) индуцировать локальную экспрессию IFN типа I и II, которые, как известно, способны вызывать гибель опухолевых клеток; б) активировать клеточный иммунитет. При этом гибель опухолевых клеток, их фагоцитоз и последующая презентация опухолеспецифических антигенов обуславливают дополнительную стимуляцию специфического противоопухолевого иммунитета. Однако в ряде работ [30, 55, 56] показано, что системное введение лигандов к TLR4 наоборот часто ассоциировано со стимуляцией роста опухоли. По нашему мнению, такое различие связано с тем, что внутритропуховые инъекции лиганда TLR4 (ЛПС) вызывают существенно большее накопление IFN непосредственно в опухолях, чем при системном введении лиганда. Поскольку IFN это короткодистантные эффекторные белки, действующие при достаточно высоких концентрациях, то их выработка вне опухоли (при системном введении) не приводит к гибели опухолевых клеток, а следовательно, и к развитию противоопухолевого иммунитета. При этом индуцируемые после локального или системного введения ЛПС провоспалительные цитокины и хемокины могут играть двойную роль: при внутритропуховом введении ЛПС способствовать развитию противоопухолевого иммунитета, а при системном – в отсутствие мишеней для иммунной системы – положительно влиять на рост опухоли, устойчивость ее клеток и их метастатический потенциал.

Таким образом, имеющиеся данные указывают на двойственный эффект агонистов TLR на рост опухоли. Такое двойное влияние TLR говорит о более сложной функциональной роли TLR в биологии опухоли. Понятно, что подобная роль TLR выходит за рамки простой активации фактора NF- κ B. Изучать влияние различных лигандов TLR на опухоль необходимо с учетом многих факторов, включая уровень экспрессии TLR; тип ткани, из которой происходит опухоль; микроокружение опухоли и многие другие. Системное исследование функций и роли TLR на клетках опухоли может внести существенный вклад в разработку новых противоопухолевых средств с TLR-зависимым механизмом действия. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Coussens L.M., Werb Z. // *Nature*. 2002. V. 420(6917). P. 860–867.
2. Mantovani A., Allavena P., Sica A., Balkwill F. // *Nature*. 2008. V. 454(7203). P. 436–444.
3. Okamoto T. // *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug. Targets*. 2006. V. 6(4). P. 359–372.
4. Thomas H.G., Han J.H., Balentien E., et al. // *Methods Enzymol.* 1991. V. 198. P. 373–383.
5. Kleeff J., Kusama T., Rossi D.L. // *Int. J. Cancer*. 1999. V. 81. P. 650–657.
6. Deveraux Q.L., Schendel S.L., Reed J.C. // *Cardiol. Clin.* 2001. V. 19(1). P. 57–74.
7. Dong Z., Wang J.Z., Yu F., Venkatachalam M.A. // *Am. J. Pathol.* 2003. V. 163(2). P. 663–671.
8. Bartsch H., Nair J. // *Langenbecks Arch. Surg.* 2006. V. 391(5). P. 499–510.
9. Moser B., Willmann K. // *Ann. Rheum. Dis.* 2004. V. 63 Suppl 2. P. 84–89.
10. Rasmussen S.B., Reinert L.S., Paludan S.R. // *APMIS*. 2009. V. 117(5–6). P. 323–337.
11. Palm N.W., Medzhitov R. // *Immunol. Rev.* 2009. V. 227(1). P. 221–233.
12. Zeromski J., Mozer-Lisewska I., Kaczmarek M. // *Cancer Microenviron.* 2008. V. 1(1). P. 37–42.
13. Jego G., Bataille R., Geffroy-Luseau A., et al. // *Leukemia*. 2006. V. 20(6). P. 1130–1137.
14. Seya T., Akazawa T., Uehori J., et al. // *Anticancer Res.* 2003. V. 23(6a). P. 4369–4376.
15. Grauer O.M., Molling J.W., Bennink E., et al. // *J. Immunol.* 2008. V. 15. P. 6720–6729.
16. Medzhitov R. // *Nat. Rev. Immunol.* 2001. V. 1(2). P. 135–145.
17. Pasare C., Medzhitov R. // *Nature*. 2005. V. 438(7066). P. 364–368.
18. Zasloff M. // *Nature*. 2002. V. 415(6870). P. 389–395.
19. Doyle S.E., O'Connell R.M., Miranda G.A., et al. // *J. Exp. Med.* 2004. V. 5. P. 81–90.
20. Werling D., Hope J.C., Howard C.J., Jungi T.W. // *Immunology*. 2004. V. 111(1). P. 41–52.
21. Nijhuis M.M., Pasterkamp G., Sluis N.I., et al. // *J. Vasc. Res.* 2007. V. 44(3). P. 214–222.
22. Kaisho T., Akira S. // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006. V. 117(5). P. 979–988.
23. Salaun B., Romero P., Lebecque S. // *Eur. J. Immunol.* 2007. V. 37(12). P. 3311–3318.
24. Iwasaki A., Medzhitov R. // *Nat. Immunol.* 2004. V. 5(10). P. 987–995.
25. Pasare C., Medzhitov R. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2005. V. 560. P. 11–18.
26. Li M., Zhou Y., Feng G., Su S.B. // *Curr. Mol. Med.* 2009. V. 9(3). P. 365–374.
27. Curtiss L.K., Tobias P.S. // *J. Lipid. Res.* 2009. V. 50 Suppl. P. 340–345.
28. Krieg A.M. // *J. Clin. Invest.* 2007. V. 117. P. 1184–1194.
29. Chicoine M.R., Zahner M., Won E.K. // *Neurosurgery*. 2007. V. 60. P. 372–381.
30. Harmey J.H., Bucana C.D., Lu W. // *Int. J. Cancer*. 2002. V. 101. P. 415–422.
31. Huang B., Zhao J., Shen S. // *Cancer. Res.* 2007. V. 67. P. 4346–4352.
32. Means T.K., Golenbock D.T., Fenton M.J. // *Life Sci.* 2000. V. 8. P. 241–258.
33. Diebold S.S. // *Handb. Exp. Pharmacol.* 2009. V. 188. P. 3–30.
34. West A.P., Koblansky A.A., Ghosh S. // *Annu Rev. Cell. Dev. Biol.* 2006. V. 22. P. 409–437.
35. Zhang Z., Schluesener H.J. // *Cell Mol. Life Sci.* 2006. V. 63(24). P. 2901–2907.
36. O'Neill L.A., Bowie A.G. // *Nat. Rev. Immunol.* 2007. V. 7(5). P. 353–364.
37. Stockfleth E., Trefzer U., Garcia-Bartels C. // *Br. J. Dermatol.* 2003. V. 149 (Suppl. 66). P. 53–56.
38. Noguerras S., Merino A., Ojeda R. // *Heart. Circ. Physiol.* 2008. V. 294. P. 708–713.
39. Okamoto M., Oshikawa T., Tano T., et al. // *J. Immunother.* 2006. V. 29. P. 78–86.
40. D'Agostini C., Pica F., Febbraro G., et al. // *Int. Immunopharmacol.* 2005. V. 5(7–8). P. 1205–1212.
41. Morales A., Eiding D., Bruce A.W. // *J. Urol.* 1976. V. 116. P. 180–183.
42. Street S.E., Cretney E., Smyth M.J. // *Blood*. 2001. V. 1; 97(1). P. 192–197.
43. Swann J.B., Hayakawa Y., Zerafa N., et al. // *J. Immunol.* 2007. V. 15;178(12). P. 7540–7549.
44. Martinez F.O., Sica A., Mantovani A., et al. // *Front. Biosci.* 2008. V. 13. P. 453–461.
45. Balkwill F., Coussens L.M. // *Nature*. 2004. V. 431. P. 405–406.
46. Robak P., Smolewski P., Robak T. // *Leuk. Lymphoma*. 2008. V. 49. P. 1452–1462.
47. Pikarsky E., Porat R.M., Stein I., et al. // *Nature*. 2004. V. 431. P. 461–466.
48. Palayoor S.T., Youmell M.Y., Calderwood S.K., et al. // *Oncogene*. 1999. V. 18. P. 7389–7394.
49. Griffin J.D. // *Blood*. 2001. V. 98. P. 2291.
50. Philip M., Rowley D.A., Schreiber H. // *Semin. Cancer Biol.* 2004. V. 14. P. 433–439.
51. Swann J.B., Vesely M.D., Silva A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. V. 105. P. 652–656.
52. Щебляков Д.В., Логунов Д.Ю., Зубкова О.В. и др. // *Мол. генетика, микробиол. и вирусол.* 2008. № 4. С. 6–9.
53. Logunov D., Scheblyakov D., Zubkova O., et al. // *Oncogene*. 2008. V. 27. P. 4521–4531.
54. Kim S., Takahashi H., Lin W.W., et al. // *Nature*. 2009. V. 457. P. 102–106.
55. Luo J.L., Maeda S., Hsu L.C., et al. // *Cancer Cell*. 2004. V. 6. P. 297–305.
56. Huang B., Zhao J., Li H. // *Cancer Res.* 2005. V. 65. P. 5009–5014.
57. Kim W.Y., Lee J.W., Choi J.J., et al. // *Int. J. Gynecol. Cancer*. 2008. V. 18. P. 300–305.
58. Droemann D., Albrecht D., Gerdes J., et al. // *Respir. Res.* 2005. V. 6. P. 1–6.
59. Iivesaro J.M., Merrell M.A., Swain T.M., et al. // *Prostate*. 2007. V. 67. P. 774–781.
60. Lotze M.T., Zeh H.J., Rubartelli A., et al. // *Immunol. Rev.* 2007. V. 220. P. 60–81.
61. Ellerman J.E., Brown C.K., Vera M., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2008. V. 13. P. 2836–2848.
62. Cabezon T., Celis J.E., Skibshoj I., et al. // *Int. J. Cancer*. 2007. V. 121. P. 1433–1444.
63. Adams S., O'Neill D.W., Nonaka D., et al. // *J. Immunol.* 2008. V. 181. P. 776–784.
64. Spaner D.E., Miller R.L., Mena J., et al. // *Leuk. Lymphoma*. 2005. V. 46. P. 935–939.
65. Dudek A.Z., Yunis C., Harrison L.I., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2007. V. 13. P. 7119–7125.
66. Schmidt J., Welsch T., Jäger D., et al. // *Br. J. Cancer*. 2007. V. 97. P. 598–604.
67. Karin M., Yamamoto Y., Wang Q.M. // *Nat. Rev. Drug.* 2004. V. 3. P. 17–26.

УДК 576.35:577.112.8:577.21:591.3

Молекулярные основы поддержания самообновления и плюрипотентности эмбриональных стволовых клеток млекопитающих

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

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

Поступила в редакцию 28.07.2010 г.

РЕФЕРАТ Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) млекопитающих обладают рядом специфических свойств, делающих их уникальным объектом фундаментальных и прикладных исследований. Находясь в культуре, они способны неограниченно по времени поддерживать недифференцированное состояние и давать во время дифференцировки производные всех трех зародышевых листков: эктодермы, энтодермы и мезодермы, т.е. потенциально могут производить более 200 типов клеток, из которых состоит тело взрослого млекопитающего. Эти свойства ЭСК называются самообновлением и плюрипотентностью. В обзоре рассмотрены основные сигнальные пути, участвующие в поддержании плюрипотентности ЭСК, дается характеристика основных генов, входящих в подсистему «внутренних регуляторов плюрипотентности», описываются кодируемые ими белки, их регуляция и взаимодействие с другими факторами. Кроме того, в обзоре описываются роль эпигенетических механизмов и микроРНК в системе поддержания самообновления и плюрипотентности ЭСК, а также связь плюрипотентности и процесса инактивации X-хромосомы у самок млекопитающих.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА эмбриональные стволовые клетки, плюрипотентность, транскрипционные факторы, инактивация X-хромосомы.

СОКРАЩЕНИЯ ЭСК – эмбриональные стволовые клетки, ТСК – трофобластные стволовые клетки, ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, ВКМ – внутренняя клеточная масса, ВКНП – высококонсервативные некодирующие последовательности.

ЭМБРИОГЕНЕЗ МЛЕКОПИТАЮЩИХ И СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ. ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ КЛЕТКИ *IN VIVO* И *IN VITRO*

Развитие организма любого млекопитающего начинается с единственной клетки – зиготы. В результате последовательного деления и дифференцировки клеток формируется организм, который состоит более чем из 200 типов клеток, каждый из которых, образуя при взаимодействии с другими типами клеток ткани и органы, выполняет специфическую функцию. Специфичность выполняемых функций, биохимии и физиологии каждого типа клеток обеспечивается характерным паттерном экспрессии генов. Все разнообразие РНК, транскрибируемое в ядре клетки,

носит название «транскриптом», который, в отличие от генома, различается между клетками разного типа в пределах организма. Транскриптом клетки определяется тесным взаимодействием генетической и эпигенетической систем. К генетической системе можно отнести систему белков – транскрипционных факторов, модулирующих экспрессию генов-мишеней на уровне транскрипции. В эпигенетическую систему входят белки, обеспечивающие дифференциальную транскрипцию генов через изменение и поддержание структуры хроматина путем химической модификации ДНК промоторных областей генов (метилирование цитозина в положении 5', в CpG-динуклеотидах), метилирования и ацетилирования гистонов и других

модификаций. В регуляции транскрипции генов участвует также система микроРНК, регулирующая экспрессию генов на посттранскрипционном уровне [1].

На различных стадиях онтогенеза млекопитающих можно выделить типы клеток, стоящие особняком от всех остальных, так называемые стволовые клетки. Стволовые клетки характеризуются уникальным транскриптомом и совокупностью компонентов генетической и эпигенетической систем, которые позволяют им поддерживать самообновление, т.е. оставаться стволовыми клетками (ограниченное или продолжительное время, в зависимости от типа стволовых клеток), а также сохранять способность к дифференцировке в различные клеточные производные [2]. В зависимости от широты спектра клеточных типов, в которые могут дифференцироваться стволовые клетки, их разделяют на несколько видов [2].

Тотипотентные клетки – клетки, способные давать во время дифференцировки все возможные клеточные производные, из которых состоит организм. Клетки, обладающие свойством тотипотентности, также участвуют в формировании экстраэмбриональных органов и тканей, например, плаценты. У млекопитающих тотипотентными являются только зигота и бластомеры во время первых делений дробления.

Плюрипотентные клетки – клетки, способные производить во время дифференцировки производные трех примитивных зародышевых листков: эктодермы, энтодермы и мезодермы. В онтогенезе из плюрипотентных клеток может полностью сформироваться тело взрослого организма. Однако эти клетки не способны дать начало экстраэмбриональным органам и тканям. Плюрипотентными являются клетки внутренней клеточной массы и эпибласта эмбрионов млекопитающих, а также их производные – культивируемые *in vitro* эмбриональные стволовые клетки. Кроме того, плюрипотентными являются эмбриональные герминальные клетки – производные предшественников гамет, и эпибластные стволовые клетки, получаемые из эпибласта постимплантационных эмбрионов мыши [3–5]. В последние годы активно развиваются технологии получения плюрипотентных клеток из дифференцированных клеток взрослого организма путем экспрессии в них экзогенных факторов. Этот тип клеток получил название индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК). К настоящему моменту получены ИПСК человека, мыши и ряда других млекопитающих [6–8].

Мультипотентные клетки – это региональные стволовые клетки (стволовые клетки взрослого организма, находящиеся среди дифференцированных клеток различных тканей), которые способны диф-

ференцироваться в несколько типов клеток. Пример клеток такого типа – гематопозитические стволовые клетки, дающие во время дифференцировки клетки крови.

Унипотентные клетки – это клетки, являющиеся предшественниками только лишь одного типа клеток. Например, сперматогониальные стволовые клетки – предшественники мужских гамет.

Как уже упоминалось, у млекопитающих зигота и бластомеры эмбриона вплоть до 8-клеточной стадии развития являются тотипотентными. Потенциально из каждого бластомера 8-клеточного эмбриона можно получить все возможные клеточные производные, включая клетки, из которых состоят экстраэмбриональные органы. Это свойство бластомеров подтверждается в экспериментах по получению агрегационных химер. Однако уже на стадии 8 бластомеров и при переходе к стадии 16 бластомеров (стадии морулы) происходит первое дифференцировочное событие в предимплантационном эмбриогенезе млекопитающих. Каждый из 8 бластомеров подвергается либо симметричному делению, образуя две полярные наружные клетки морулы, либо делится асимметрично, давая полярную наружную клетку и неполярную клетку меньшего размера, находящуюся внутри эмбриона. Таким образом, после четвертого деления зиготы образуется эмбрион, состоящий из двух первых специализированных групп клеток: наружных полярных и внутренних неполярных [9]. В ходе последующих двух клеточных делений наружные полярные клетки морулы формируют наружный клеточный слой бластоцисты – трофоэктодерму. Трофоэктодерма необходима для имплантации эмбриона в слизистую оболочку матки и формирования плаценты. При формировании трофоэктодермы клетки располагаются таким образом, что образуют шарообразную структуру с полостью внутри – бластоцелью. Внутренние неполярные клетки морулы преобразуются во внутреннюю клеточную массу (ВКМ) эмбриона, расположенную на одном из полюсов бластоцисты с внутренней стороны слоя трофоэктодермы. Перед имплантацией эмбриона в матку ВКМ разделяется на два слоя: эпибласт (примитивная/эмбриональная эктодерма) и гипобласт (примитивная/эмбриональная энтодерма). В ходе эмбрионального развития из эпибласта формируется тело эмбриона, все его ткани и органы, развивающийся гипобласт, в свою очередь, образует желточный мешок. Таким образом, предимплантационный эмбрион млекопитающих – бластоциста – состоит из трех компартментов: трофоэктодермы, гипобласта и эпибласта, два из которых (трофоэктодерма и гипобласт) дают начало экстраэмбриональным (внезародышевым) органам и тканям, а один

формирует во время эмбриогенеза все ткани тела эмбриона [10]. Структура предимплантационных эмбрионов очень схожа у различных видов млекопитающих. Так, бластоцисты приматов очень сходны по структуре с бластоцистами грызунов, различия заключаются лишь в большем числе клеток, из которых состоит эмбрион, и различной морфологии эмбриона после его имплантации. Однако, несмотря на схожесть структуры, бластоцисты приматов отличаются от эмбрионов грызунов по времени разделения компартментов (трофоэктодерма, гипобласт и эпибласт), а также характеризуются более длительным предимплантационным развитием (7–10 сут у приматов против 4 сут у мыши) [11].

Все три компартмента предимплантационных эмбрионов млекопитающих: эпибласт, трофоэктодерма и гипобласт – являются источниками стабильных линий стволовых клеток, названных соответственно эмбриональными стволовыми клетками, трофобластными стволовыми клетками и стволовыми клетками экстраэмбриональной энтодермы. Культивируемые стволовые клетки сохраняют большинство свойств, характерных для их предшественников. Это касается паттерна экспрессии генов, эпигенетических характеристик, многих биохимических и физиологических показателей. Наиболее наглядно «стволовой» статус и соответствие клеточных линий их предшественникам, существующим *in vivo*, доказывается путем инъекции клеток в реципиентную бластоцисту. После инъекции ЭСК, ТСК и клетки экстраэмбриональной энтодермы включаются в эмбриогенез, участвуя в формировании соответствующих эмбриональных либо экстраэмбриональных тканей и органов. Все три типа клеточных линий, получаемых из предимплантационных эмбрионов, нуждаются в специфических условиях культивирования для поддержания своего «стволового» статуса. К таким условиям относятся состав среды и наличие ростовых факторов, иногда требуется сокультивирование с другими типами клеток, выделяющими необходимые для поддержания недифференцированного состояния стволовых клеток факторы [12–18].

Среди трех типов стволовых клеток, получаемых из бластоцист, особое место занимают эмбриональные стволовые клетки, обладающие свойствами самообновления и плюрипотентности. Самообновление подразумевает способность бесконечно симметрично делиться, давая две плюрипотентные клетки. Как уже упоминалось выше, плюрипотентность – это свойство стволовых клеток дифференцироваться в производные всех трех примитивных зародышевых листков, но не внезародышевых тканей. Именно плюрипотентность делает ЭСК уникальной моделью для исследования процессов, происходя-

щих во время дифференцировки клеток, открывает широкие перспективы использования ЭСК в фундаментальных исследованиях биологических явлений, происходящих на ранних этапах онтогенеза млекопитающих (например, процесса инактивации X-хромосомы, эпигенетических изменений генома и др.). Кроме того, ЭСК находят применение и в прикладных исследованиях, их уникальные свойства могут использоваться при тестировании новых лекарственных препаратов, исследовании токсического эффекта химических соединений. ЭСК являются перспективным источником материала для заместительной клеточной терапии заболеваний человека, хотя безопасность их применения в данной области по сей день тщательно изучается и обсуждается научным сообществом.

В настоящее время ведется активное исследование молекулярных основ самообновления и плюрипотентности эмбриональных стволовых клеток. На сегодняшний день известно, что поддержание плюрипотентного статуса клеток предимплантационных эмбрионов и ЭСК обеспечивается сложной системой клеточно-поверхностных белков, их молекулярных сигнальных путей и транскрипционных факторов, инициирующих или модулирующих транскрипцию генов-мишеней. В поддержании плюрипотентности ЭСК принимают участие несколько сигнальных каскадов, или путей. Эти пути можно объединить в подсистему «внешних регуляторов плюрипотентности». Многочисленные экспериментальные данные говорят о том, что эта подсистема эволюционно не консервативна. Сигнальные молекулы (например, LIF, BMP4) имеют противоположное влияние на самообновление ЭСК мыши и человека [19–21].

Помимо подсистемы «внешних регуляторов» существует подсистема «внутренних регуляторов плюрипотентности», в которую входят три основных транскрипционных фактора OCT4, SOX2 и NANOG. Данные факторы имеют широкий спектр генов-мишеней в ЭСК мыши и человека, и, в отличие от сигнальных путей, их действие направлено исключительно на поддержание самообновления и плюрипотентности клеток у различных млекопитающих [22, 23].

Недавние исследования показали, что данные подсистемы тесно взаимодействуют друг с другом, обеспечивая стабильность системы поддержания самообновления и плюрипотентности [24] (рис. 1). Кроме того, установлено, что подсистемы интегрированы не только между собой, но и с системами эпигенетической регуляции экспрессии генов (белками группы Polycomb и др.), а также системой микроРНК, специфичных для ЭСК и различных дифференцированных клеточных производных.

СИГНАЛЬНЫЕ КАСКАДЫ, ЗАПУСКАЕМЫЕ ИНТЕРЛЕЙКИНОМ LIF

Первые линии ЭСК мыши были получены с использованием в качестве питающего слоя митотически инактивированных эмбриональных фибробластов (фидерного слоя) либо кондиционной среды, на которой некоторое время культивировали клетки тератокарциномы или эмбриональные фибробласты [12, 13]. Культивирование ЭСК мыши без фидерного слоя либо в некондиционной среде вызывало дифференцировку клеток. Позже была выяснена природа действующего компонента, выделяемого эмбриональными фибробластами и необходимого для поддержания недифференцированного состояния ЭСК. Им оказался интерлейкин LIF (leukemia inhibitory factor), относящийся к семейству IL-6 [25]. В настоящее время рекомбинантный белок LIF активно применяется при получении и культивировании ЭСК мыши, что позволяет избежать использования фидера и кондиционной среды [26, 27]. Белок LIF, взаимодействуя с гетеродимерным рецептором LIFRβ-gp130, находящимся на мембране клетки, способен к активации трех сигнальных каскадов: каскада JAK (tyrosine kinase Janus)-STAT3, сигнального пути, опосредованного фосфатидилинозитол-3-ОН-киназой,

и каскада митоген-активируемой протеинкиназы. Среди данных сигнальных путей только JAK-STAT3 активируется исключительно LIF, остальные два запускаются множеством сигнальных молекул [24].

В сигнальном пути JAK-STAT3 LIF является первичной сигнальной молекулой в пути, активирующем транскрипционный фактор STAT3 (signal transducer and activator of transcription-3). Связывание интерлейкина LIF с рецептором LIFRβ-gp130 вызывает активацию фосфопротеинкиназ. Тирозинкиназа Janus и иммунореактивная фосфотирозинкиназа фосфорилируют тирозиновые остатки цитоплазматической части гетеродимера LIFRβ-gp130. Транскрипционный фактор STAT3 связывается с фосфотирозиновыми остатками активированного гетеродимера LIFRβ-gp130, подвергаясь при этом фосфорилированию и димеризации. Фосфорилированные димеры STAT3 транспортируются в ядро клетки, где взаимодействуют с генами-мишенями [25, 28].

Исследования убедительно показывают важную роль LIF-STAT3-сигнального пути в поддержании самообновления ЭСК мыши [29]. Однако многочисленные факты говорят о том, что поддержание плюрипотентности ЭСК человека и других приматов происходит по LIF-STAT3-независимому механизму [21, 30].

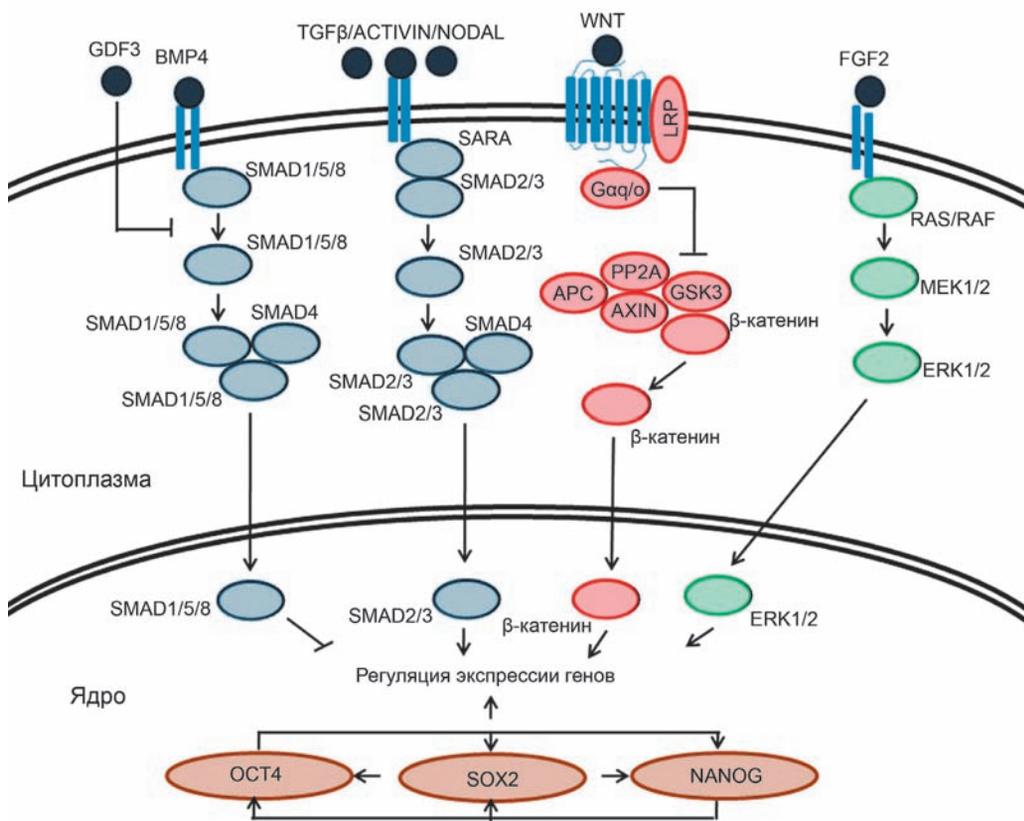


Рис. 1. Система действия «внешних» и «внутренних регуляторов плюрипотентности» ЭСК человека. Темными кругами показаны сигнальные молекулы, синими столбиками рецепторы на плазматической мембране клетки. Серыми, красными и зелеными овалами показаны молекулы, участвующие в передаче сигнала от рецепторов в ядро клетки и в регуляции экспрессии генов в ядре клетки совместно с транскрипционными факторами OCT4, SOX2 и NANOG. Стрелками показано активирующее действие факторов, линиями с тупыми окончаниями – подавляющее действие, а также активность SMAD1/5/8, вызывающая дифференцировку ЭСК человека.

До недавнего времени существовало относительно мало данных о том, каким образом интерлейкин LIF может участвовать в поддержании плюрипотентности ЭСК мыши. Недавние исследования, проведенные Нива с коллегами [24], показывают, что молекулярные каскады, запускаемые LIF, интегрированы в подсистему «внутренних регуляторов плюрипотентности», в которую входят гены *Oct4*, *Sox2* и *Nanog* (рис. 1). Эта интеграция происходит благодаря двум параллельным путям: JAK-STAT3 и сигнальному пути, опосредованному фосфатидилинозитол-3-ОН-киназой (PI(3)K). В ходе исследования показано, что транскрипционный фактор STAT3 активирует экспрессию фактора KLF4, который, в свою очередь, позитивно регулирует ген *Sox2*. В то же время сигнальный путь фосфатидилинозитол-3-ОН-киназы активирует ген, кодирующий другой транскрипционный фактор – TBX3. Данный фактор, в свою очередь, активирует ген *Nanog*. Кроме того, показано, что применение ингибиторов митоген-активируемой протеинкиназы, которая опосредует третий сигнальный каскад, активируемый LIF, вызывает аккумуляцию белка TBX3 в ядре клетки и активацию генов *Tbx3* и *Nanog* (рис. 2). Кроме того, LIF может активировать транспорт TBX3 за счет действия через киназу MAPK (рис. 2), однако данный путь, по-видимому, ингибируется какими-то третьими факторами.

СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ TGFβ/ACTIVIN/NODAL, BMP И ФАКТОР bFGF (FGF2)

В суперсемейство TGFβ (transforming growth factor-β) входит большое число сигнальных молекул (в геноме человека обнаружено около 40 потенциальных белков-лигандов TGFβ). Данное суперсемейство можно разделить на две большие группы активаторов:

- 1) TGFβ/ACTIVIN/NODAL, активирующие транскрипцию генов транскрипционных факторов SMAD2/3 (similar to mothers against decapentaplegic homologue) посредством рецепторов ALK4, ALK5 и ALK7;
- 2) BMP (bone morphogenic protein)/GDF (growth differentiation factor) посредством рецепторов ALK1, ALK2, ALK3 и ALK6, активирующие факторы SMAD1/5. Кроме того, существуют два белка семейства SMAD, обладающие ингибирующими свойствами по отношению к белкам того же семейства: SMAD6, избирательно ингибирующий SMAD1/5, и SMAD7, подавляющий действие членов обеих групп суперсемейства TGFβ [31].

Показано, что сигнальный путь TGFβ/ACTIVIN/NODAL играет существенную роль в поддержании плюрипотентности ЭСК человека. Белки ACTIVIN и NODAL действуют через одни и те же ре-

цепторы, подавляя дифференцировку ЭСК человека [32–34]. ЭСК человека экспрессируют как рецепторы ACVR1B и ACVR1B и корецептор TDGF1(CRIPTO) для NODAL, так и сам NODAL [35]. В культурах ЭСК человека NODAL или ACTIVIN могут действовать совместно с другими белковыми факторами, например, bFGF (FGF2) или WNT при поддержании самообновления ЭСК человека [32, 34, 36, 37]. Белок ACTIVIN может активировать выработку bFGF, необходимого для поддержания самообновления ЭСК человека при культивировании клеток в отсутствие сыворотки [36]. Оба белка ACTIVIN и NODAL могут быть заменены TGFβ при культивировании ЭСК человека.

Белковый фактор NODAL выполняет множество различных функций во время раннего эмбриогенеза мыши. Он необходим для нормального развития эпибласта эмбрионов и поддержания экспрессии генов *OCT4* и *NANOG* человека. В недифференцированных ЭСК человека наблюдается высокая активность NODAL/ACTIVIN/TGFβ, направленная на активацию транскрипционных факторов SMAD2 и/или

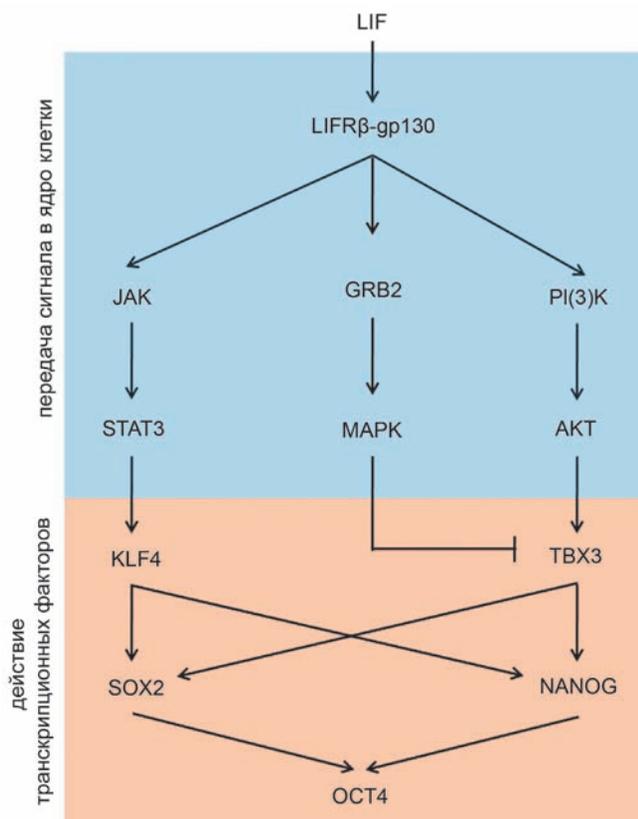


Рис. 2. Взаимодействие транскрипционных факторов и сигнальных путей, запускаемых LIF в эмбриональных стволовых клетках мыши [24].

SMAD3 (рис. 1). Транскрипционные факторы SMAD2 и SMAD3 участвуют в активации транскрипции гена *NANOG*. В недифференцированных ЭСК человека наблюдается высокий уровень фосфорилированной, т.е. активной формы SMAD2 и SMAD3. Подавление фосфорилирования SMAD2 и SMAD3 с помощью специфических ингибиторов вызывает уменьшение уровня экспрессии генов *OCT4* и *NANOG* [32]. Во время дифференцировки уровень активности SMAD2 и SMAD3 падает, при этом возрастает уровень SMAD1/5/8, которые активирует BMP (рис. 1). Белки SMAD1/5/8 подавляют транскрипцию гена *NANOG*. Кроме того, действие SMAD2 и SMAD3, а также сигнальный путь, запускаемый FGF2 (bFGF), подавляет экспрессию BMP4, препятствуя спонтанной дифференцировке ЭСК человека [37].

В суперсемейство TGF β входит белок GDF, который не только является ингибитором BMP, но и усиливает действие NODAL (рис. 1). Ген *GDF* экспрессируется в плюрипотентных клетках человека и мыши, где участвует в подавлении дифференцировки, опосредованной BMP. В конечном итоге, GDF влияет на самообновление ЭСК через установление баланса между белками SMAD2 и SMAD3 с одной стороны и SMAD1/5/8 с другой [38, 39] (рис. 1).

Белковые факторы из группы BMP оказывают противоположное действие на самообновление ЭСК мыши. Присутствие в среде BMP4 подавляет нейтральную дифференцировку и в комбинации с LIF поддерживает симметричное самообновление ЭСК мыши в отсутствие слоя фидера и сыворотки. BMP4 мыши активирует экспрессию транскрипционного фактора SMAD4, который, в свою очередь, активирует транскрипцию генов, относящихся к семейству *Id* (inhibitor of differentiation). Вероятно, экспрессия генов *Id1*, *Id2* и *Id3* предотвращает эффект ранней экспрессии генов пронеуральных транскрипционных факторов (bHLH), таких, как гены группы *Mash* в ЭСК, тем самым препятствуя дифференцировке [40]. Однако в отсутствие LIF BMP4 может иметь противоположное действие, активируя факторы из семейства SMAD (SMAD1/5/8), которые оказывают ингибирующее действие на гены семейства *Id* [40].

Таким образом, сигнальные пути, запускаемые BMP и LIF-JAK-STAT3, действуют разнонаправленно на самообновление ЭСК мыши и человека. Однако это не единственные примеры видоспецифического действия сигнальных молекул. Например, фактор bFGF является критичным для поддержания ЭСК человека в недифференцированном состоянии, но вызывает дифференцировку ЭСК мыши [41, 42]. ЭСК человека экспрессируют рецептор и сам bFGF [43, 44]. Действует bFGF через тирозинкиназные рецепторы (ERK1 и ERK2), ингибирование данного сиг-

нального пути вызывает дифференцировку ЭСК человека (рис. 1). Однако полностью механизм действия bFGF на ЭСК человека пока не расшифрован.

СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ WNT

Недавние исследования показали, что сигнальный путь, в котором ключевым участником является WNT, может участвовать в краткосрочном поддержании плюрипотентного состояния ЭСК мыши и человека [45]. Ингибирование гликогенсинтазы-3, которое вызывает активацию сигнального пути WNT, приводит к накоплению в ядрах клеток β -катенина и активации ряда генов-мишеней, при этом в клетках поддерживается экспрессия специфичных для плюрипотентных клеток генов транскрипционных факторов *Oct4*, *Rex1* и *Nanog* даже в отсутствие фактора LIF [46] (рис. 1). Однако позже было показано, что для стабильного поддержания самообновления ЭСК человека необходимо присутствие таких факторов, как TGF β и bFGF, а действие WNT сводится к усилению пролиферации [47, 48].

ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ OCT4, NANOG И SOX2

Транскрипционные факторы OCT4, NANOG и SOX2 занимают центральное место в подсистеме «внутренних регуляторов плюрипотентности». В отличие от системы сигнальных путей, действие которых носит четко выраженный видоспецифичный характер, функции данных транскрипционных факторов при поддержании самообновления и плюрипотентности ЭСК человека и мыши существенно перекрываются. Большой консервативностью обладают геномная организация генов *Oct4*, *Sox2* и *Nanog* и доменная организация белков OCT4, NANOG и SOX2, существенной схожестью обладают спектры генов-мишеней данных факторов в ЭСК мыши и человека. Как у мыши, так и у человека факторы OCT4, NANOG и SOX2 часто действуют совместно, образуя единую систему регуляции транскрипции генов, включая авторегуляцию собственных генов.

ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ФАКТОР OCT4

Белок OCT4 относится к V классу POU (PIT, OCT, UNC) семейства транскрипционных факторов. POU-домен состоит из двух структурно независимых субдоменов: POU-специфического (N-концевой, состоящий из 75 а.о.) и POU-гомеодомена (C-концевой, 60 а.о.). Оба субдомена соединены между собой варибельным по длине подвижным линкером [49–51]. Экспрессия белка OCT4 характерна для ранних стадий эмбриогенеза человека, мыши и других млекопитающих [52–56]. У мыши его экспрессия прослеживается от 2-клеточной стадии и ограничивается

плюрипотентными клетками ВКМ и эпибласта blastocysts. После имплантации эмбриона экспрессия *OCT4* сохраняется только в герминальных клетках. У человека на стадии blastocysts экспрессия *OCT4* обнаруживается не только в ВКМ, но и в клетках трофобласта [57]. Роль фактора *OCT4* в эмбриогенезе была показана в экспериментах по нокауту гена *Oct4* (также известному как *Pou5f1*, *Oct3*, *Oct3/4*, *OTF3*, *OTF4*). Эмбрионы мыши, гомозиготные по мутации *Oct4* (*Oct4*^{-/-}), погибали во время имплантации вследствие неспособности образовывать ВКМ, состоящую из плюрипотентных клеток, при этом трофобласт развивался нормально [53]. Позже Нива с соавторами продемонстрировали влияние уровня экспрессии *Oct4* на самообновление ЭСК мыши [58]. Было обнаружено, что 50% колебание уровня транскрипции *Oct4* вызывает дифференцировку ЭСК мыши в трофобластные либо энтодермальные производные [58]. Кроме того, активность *OCT4* необходима для нормальной жизнедеятельности герминальных клеток мыши [59]. Подавление экспрессии гена *Oct4* в ЭСК мыши и человека с помощью РНК-интерференции также вызывало дифференцировку в различные клеточные производные, экспрессирующие маркеры трофобласта и энтодермы: *Cdx2*, *Gata6*, *AFP* [60, 61]. Исследования геномной структуры, структуры регуляторной области и хромосомной локализации гена *Oct4* у человека и других млекопитающих показали высокую степень консервативности молекулярной организации данного гена. Кроме того, показано, что у ряда видов млекопитающих ген *Oct4* входит в состав схожей синтенной группы [62–65]. У мыши и других животных ген *Oct4* состоит из пяти экзонов и локализован в области главного комплекса гистосовместимости [62, 63, 65, 66]. Ген *OCT4* человека также локализован в пределах главного комплекса гистосовместимости, однако у него обнаружены три альтернативных варианта сплайсинга: *OCT4A*, *OCT4B* и *OCT4B1* [62, 67]. Белки, кодируемые данными изоформами, по-разному вовлечены в процесс поддержания плюрипотентности. Показано, что белок *OCT4B* не способен поддерживать плюрипотентность ЭСК и локализуется в основном в цитоплазме клеток [68]. Экспрессия *OCT4A* обнаружена на стадии компактной морулы и blastocysts человека, в то время как *OCT4B* экспрессируется во всех клетках эмбриона, начиная с 4-клеточной стадии. Кроме того, *OCT4B* не экспрессируется в ЭСК человека [69]. В отличие от гена *Oct4* животных, в настоящий момент в транскрипте гена *OCT4* человека выделяют четыре экзона. Второй экзон подразделяется на четыре субэкзона (2a, 2b, 2c, 2d), которые представлены в разных комбинациях в трех различных вариантах сплайсинга транскрипта. Вариант *OCT4A* состоит из экзонов 1,

2b, 2d, 3 и 4; вариант *OCT4B* – 2a, 2b, 2d, 3 и 4; вариант сплайсинга *OCT4B1* – 2a, 2b, 2c, 3 и 4. Таким образом, транскрипты гена *OCT4* идентичны в 3'-области (3–4 экзон), а все отличия касаются лишь 1–2 экзонов. Транскрипт *OCT4A* кодирует белок размером 360 а.о., размер белка *OCT4B* – 265 а.о., однако ввиду наличия полиморфизма в стартовом кодоне *OCT4B* (*AU/GG*) у части популяции не транслируется данный вариант белка *OCT4B* [62, 70]. Благодаря недавно обнаруженному альтернативному сайту посадки рибосом в области субэкзонов 2a–b с транскрипта *OCT4B* могут транслироваться еще две формы белка: *OCT4B-190* и *OCT4B-164*, которые состоят из 190 и 164 а.о. соответственно. Белкового продукта *OCT4B1* не обнаружено, возможно, благодаря наличию стоп-кодона *UGA* в субэкзоне 2c, который отсутствует в *OCT4B* [67]. Ранее было показано, что белок, кодируемый изоформой *OCT4A*, локализуется в ядре клетки и принимает участие в регуляции транскрипции генов, в то же время белок *OCT4B* локализуется в цитоплазме клеток и не способен поддерживать плюрипотентность [57, 68]. Позже было установлено, что белки *OCT4B-190* и *OCT4B-164*, кодируемые *OCT4B*, локализуются диффузно в ядре и цитоплазме [70], при этом уровень *OCT4B-190* существенно повышается в ЭСК человека в ответ на стрессовые условия и может оказывать подавляющее действие на процесс апоптоза. Экспрессия *OCT4B-265* и *OCT4B-164* в ЭСК человека не обнаружена [70].

ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ФАКТОР NANOG

Белок NANOG относится к транскрипционным факторам, содержащим гомеодомен, и наиболее близок по аминокислотной последовательности и структуре к белкам семейства NK2 [71]. Экспрессия гена *NANOG* характерна для плюрипотентных клеток предэмбриональных эмбрионов (ВКМ и эпибласта) и ЭСК мыши и человека [72–74]. Сверхэкспрессия гена *Nanog* способна поддерживать плюрипотентность ЭСК мыши даже в отсутствие интерлейкина LIF [72]. Мутационный анализ гена *Nanog* показал, что его экспрессия необходима для нормального развития эпибласта эмбриона и поддержания самообновления ЭСК мыши. ЭСК с генотипом *Nanog*^{-/-} дифференцировались в экстраэмбриональные производные [73]. Подавление экспрессии *NANOG* в ЭСК человека вызывает дифференцировку, сопровождающуюся повышением экспрессии маркеров энтодермы (*GATA4*, *GATA6*, *LAMININ B1*, *AFP*) и трофоэктодермы (*CDX2*, *GATA2*, *hCG-α* и *hCG-β*).

В молекуле белка NANOG мыши выделяют несколько функциональных элементов, принимающих участие в трансактивации. Среди них гомеодомен, занимающий центральное положение в молекуле,

и три элемента в С-терминальной части молекулы: С-терминальный домен 1 (CD1), С-терминальный домен 2 (CD2) и триптофановый повтор (W-повтор), находящийся между CD1 и CD2. Наибольший вклад в трансактивацию NANOG мыши вносят гомеодомен, CD2 и W-повтор [75, 76]. Недавние исследования показывают, что W-повтор белка NANOG мыши обеспечивает трансактивацию. Он участвует в димеризации белка NANOG, которая необходима для LIF-независимого поддержания плюрипотентности ЭСК мыши [77, 78]. По всей видимости, функциональную роль играют именно остатки триптофана. Замена триптофана на аланин вызывает существенное снижение трансактивационной способности белка NANOG мыши, в то время как замена остальных аминокислот в пределах мономеров W-повтора не вызывает существенного изменения активности [76]. Еще одним важным трансактивационным элементом белка NANOG является CD2 [79]. Данный элемент необходим для NANOG-опосредованного самообновления ЭСК мыши. Обнаружено, что активность домена CD2 зависит от наличия в нем остатков ароматических аминокислот (фенилаланина и тирозина). Замена данных аминокислот вызывает падение активности CD2 и, как следствие, снижение активности целых молекул NANOG и дифференцировку ЭСК [79]. Однако сравнение аминокислотных последовательностей CD2 различных видов млекопитающих показало низкую эволюционную консервативность большинства остатков ароматических аминокислот [80].

ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ФАКТОР SOX2

Транскрипционный фактор SOX2 (SRY-related HMG box) содержит ДНК-связывающий HMG (high mobility group)-домен. Экспрессия SOX2, как и OCT4, характерна для клеток ВКМ, эпибласта и герминальных клеток эмбриона мыши [81].

Гомозиготные по мутации гена SOX2 эмбрионы гибнут во время имплантации вследствие недоразвития эпибласта. Из мутантных эмбрионов невозможно получить стабильные линии ЭСК, при этом линии ТСК и клеток экстраэмбриональной энтодермы получают нормально [81]. Кроме того, нормальная экспрессия гена *Sox2* необходима для поддержания самообновления ЭСК мыши и человека [82, 83]. Подавление и сверхэкспрессия SOX2 вызывают трофоэктодермальную дифференцировку ЭСК человека [83].

ГЕНЫ-МИШЕНИ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ OCT4, NANOG И SOX2

OCT4, NANOG и SOX2 относятся к белкам, экспрессия которых необходима для поддержания плюрипотентности ЭСК мыши и человека в стандартных условиях культивирования. Безусловно, их важная

роль в поддержании основных свойств ЭСК заключается в функционировании как транскрипционных факторов. В настоящий момент существует огромный массив данных о спектре генов-мишеней данных белков.

Было выяснено, что транскрипционный фактор OCT4 является активатором и репрессором многих генов-мишеней, большинство из которых тем или иным образом участвуют в процессе раннего эмбрионального развития: генов *Fgf4*, *Opn*, *Utf1*, генов, кодирующих α - и β -субъединицы хорионального гонадотропина человека [84–88]. Транскрипционный фактор OCT4 может регулировать гены-мишени в виде мономера, гомо- и гетеродимера [89]. Например, образуя гомодимер, белок OCT4 регулирует транскрипцию гена *Opn*. Энксансерный элемент *Opn* содержит палиндромную последовательность, названную PORE (palindromic-oct-regulatory-element), которая включает в себя октамерный мотив ATGCAAAT (октамерный сайт посадки мономерной формы белка OCT4) и последовательность ATTTG, отделенную от октамерного мотива двумя парами нуклеотидов. Рядом с PORE локализуется сайт посадки фактора SOX2, однако он оказывает подавляющее действие на транскрипцию *Opn* [84].

Существуют примеры совместного действия факторов OCT4 и SOX2. Данные белки позитивно регулируют гены *Fgf4* и *Utf1*, их сайты посадки локализованы в энхансерах, расположенных в 3'-нетранслируемых областях этих генов [85, 86, 90]. Помимо PORE, существует еще один элемент, с которым взаимодействуют мономеры и димеры OCT-факторов, он был назван MORE (more of PORE, ATGCATATGCAT) [91, 92]. Элемент MORE существенно отличается от PORE по относительному расположению POU-специфического и POU-гомеодомена. Несмотря на то что MORE был изначально синтезирован искусственно, наличие подобных элементов было обнаружено в регуляторных областях реальных генов [91–93]. Показано, что транскрипционные факторы OCT1 и OCT4 могут действовать на транскрипцию генов-мишеней через элемент MORE в ответ на генотоксический и оксидативный стрессы [93].

Развитие методов высокопроизводительного анализа распределения транскрипционных факторов на уровне целого генома позволило существенно расширить наши знания о спектре генов-мишеней транскрипционных факторов OCT4, NANOG и SOX2. Две группы исследователей, используя методы ChIP-on-Chip и ChIP-PET (chromatin immunoprecipitation – paired-end ditag), локализовали OCT4, NANOG и SOX2 в геномах ЭСК человека и мыши [22, 23].

В работе Бойер [22] с соавторами проанализиро-

вано распределение сайтов посадки транскрипционных факторов OCT4, NANOG и SOX2 в геноме ЭСК человека линии H9. Среди генов, ассоциированных с данными транскрипционными факторами, большую часть составляют гены транскрипционных факторов и компоненты сигнальных путей, которые, как было установлено ранее, задействованы в раннем эмбриогенезе, дифференцировке клеток, органогенезе и поддержании самообновления и плюрипотентности ЭСК в культуре. Например, это такие гены, как OCT4, SOX2, NANOG, LEFTY2/EBAF, CDX2, HAND1, DPPA4, GJA1/CONNEXIN43, FOXO1A, CRIPTO/TDGF1 и ZIC3 [94–102]. Затем тем же образом было установлено распределение сайтов посадки факторов NANOG и SOX2. В ЭСК человека транскрипционные факторы OCT4, NANOG и SOX2 совместно регулируют 353 гена, при этом они могут выступать и как активаторы, и как репрессоры транскрипции [22]. Среди генов, позитивно регулируемых OCT4, NANOG и SOX2, большую долю занимают гены, кодирующие транскрипционные факторы, включая гены OCT4, NANOG и SOX2, а также гены, кодирующие компоненты сигнальных путей, принимающих участие в поддержании самообновления клеток, например TGF β (TDGF1, LEFTY2/EBAF) и WNT (DKK1, FRAT2) [22]. В ЭСК мыши среди генов, совместно позитивно регулируемых факторами OCT4 и NANOG, также выявляются гены, кодирующие транскрипционные факторы, например *Rcor2*, *Esrrb* и *Phc1* [23]. Кроме того, в списке генов, позитивно регулируемых NANOG в ЭСК мыши, также были гены *Pou5f1* (кодирует транскрипционный фактор OCT4) и *Sox2*. Ранее полученные экспериментальные данные говорят о том, что факторы OCT4 и SOX2 принимают участие в регуляции генов *Pou5f1*, *Sox2* и *Nanog* [97, 99, 100, 103]. По всей видимости, авторегуляция является общим свойством системы поддержания плюрипотентности у мыши и человека. Наличие большого числа генов транскрипционных факторов (таких, как REST, SKIL, HESX1 и STAT3) среди позитивно регулируемых генов говорит о том, что OCT4, NANOG и SOX2 могут являться лишь вершиной более сложной системы регуляции транскрипции в ЭСК. Среди негативно регулируемых генов также много генов транскрипционных факторов (например, ESX1I, HOXB1, MEIS1, PAX6, LHX5, Lbx1, MYF5, ONECUT1), данные факторы задействованы в процессах дифференцировки во время эмбрионального развития [22]. Скорее всего, факторы OCT4, NANOG и SOX2 принимают участие в репрессии данных генов как *in vivo*, так и *in vitro*.

В двух исследованиях [22, 23] было показано, что сайты посадки транскрипционных факторов OCT4, NANOG и SOX2 ассоциированы с генами, кодирую-

щими микроРНК. В ЭСК человека сайты связывания транскрипционных факторов OCT4, NANOG и SOX2 обнаружены в промоторах 14 генов микроРНК, причем в промоторах двух генов *mir-137* и *mir-301* они присутствуют совместно. В ЭСК мыши сайты связывания фактора NANOG расположены в пределах 6 т.п.н. от 4 генов микроРНК: *mir-296*, *mir-302*, *mir-124a* и *mir-9-2*. Более того, в случае генов *mir-296*, *mir-124a* и *mir-9-2* в ближайшем окружении сайта NANOG не обнаружено каких-либо иных генов. Для гена *mir-135* сайт связывания NANOG обнаружен в пределах 30 т.п.н., транскрипционный фактор OCT4 связывается в непосредственной близости от сайта NANOG около генов *mir-296* и *mir-302*.

Сравнение данных по выявлению генов-мишеней транскрипционных факторов OCT4 и NANOG в ЭСК мыши и человека показывает, что только небольшая часть из них обнаруживается в геномах обоих видов одновременно. Так, только 9.1% OCT4-ассоциированных генов и 13% NANOG-ассоциированных генов перекрываются у этих двух видов. Это может говорить о существовании больших различий в составе сетей генов, контролируемых OCT4 и NANOG. Однако существует группа из 32 генов, регулируемых факторами OCT4 и NANOG у мыши и человека, 18 из них кодируют транскрипционные факторы, включающие OCT4, SOX2 и NANOG, что свидетельствует о важности этих генов для поддержания плюрипотентности [23]. Разница в составе генов-мишеней, представленная в этих двух работах, вполне может быть связана с техническими причинами, поскольку в работах применялись два различных метода (ChIP-on-Chip и ChIP-PET) получения данных и алгоритма их анализа.

Таким образом, транскрипционные факторы OCT4, NANOG и SOX2 находятся в центре обширной сети регуляции, включающей транскрипционные факторы (гены которых позитивно или негативно регулируются), компоненты сигнальных путей, микроРНК. Ее стабильное функционирование, по всей видимости, необходимо для поддержания самообновления и плюрипотентности ЭСК человека и мыши.

БЕЛОК-БЕЛКОВЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В СИСТЕМЕ ПОДДЕРЖАНИЯ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК

Исследования последних лет предоставляют множество доказательств того, что транскрипционные факторы, задействованные в поддержании самообновления ЭСК, не просто совместно регулируют транскрипцию генов-мишеней, но при этом физически контактируют друг с другом [104–108]. Например, было показано, что NANOG может подавлять индуцируемую BMP мезодермальную дифферен-

цировку ЭСК мыши, связываясь с белком SMAD1, и физически взаимодействовать с транскрипционным фактором SALL4, совместно позитивно регулируя энхансеры генов *Nanog* и *Sall4* [104, 106]. Однако это были лишь отдельные примеры белок-белковых взаимодействий транскрипционного фактора NANOG, направленных на поддержание самообновления ЭСК. Применение широкомасштабного анализа взаимодействий белка NANOG, проведенного на ЭСК мыши, показало, что данный белок имеет широкий спектр взаимодействий и совокупность белков, с которыми он физически контактирует, включает не только транскрипционные факторы, но и белки, задействованные в регуляции структуры хроматина [105]. В работе Ванга с соавторами [105] был применен метод, основанный на экспрессии белка NANOG, содержащего FLAG-эпитоп, а также короткую аминокислотную последовательность, являющуюся субстратом для биотинлигазы *Escherichia coli* – BirA. Белок NANOG, содержащий два дополнительных эпитопа, экспрессировали (на уровне примерно 20% от эндогенного) в ЭСК мыши, которые также экспрессировали BirA, при этом клетки сохраняли самообновление и плюрипотентность. Комплексы NANOG выделяли из ядерного экстракта при помощи стрептавидин-агарозы или посредством иммунопреципитации антителами к FLAG с последующей очисткой стрептавидин-агарозой. Анализ и идентификацию взаимодействующих с NANOG белков проводили с помощью масс-спектрометрии (whole-lane liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS)).

По результатам данного эксперимента можно выделить несколько закономерностей. Во-первых, группа взаимодействующих с NANOG белков сильно обогащена факторами, необходимыми для нормальной жизнедеятельности и дифференцировки клеток ВКМ (плюрипотентный компартмент эмбриона) бластоцист мыши. Кроме того, согласно имеющимся литературным данным, более чем 80% взаимодействующих с NANOG белков необходимы для получения и сохранения основных свойств ЭСК [105]. Например, такие белки, как OCT4, DAX1, NAC1, ZFP281 и SALL4.

Во-вторых, большинство выявленных белков обладают сходным паттерном экспрессии, характерным для плюрипотентных клеток, и их экспрессия подавляется при дифференцировке ЭСК, что может говорить об их участии в схожих процессах и/или участии в одной системе регуляции [105].

В-третьих, выявлено, что значительная часть генов, кодирующих взаимодействующие с NANOG белки, являются потенциальными мишенями транскрипционных факторов OCT4 и NANOG в ЭСК че-

ловека и мыши [22, 23, 63]. Наличие авторегуляции, положительных и отрицательных обратных связей характерно для системы, направленной на поддержание самообновления и плюрипотентности ЭСК мыши и человека, и, по всей видимости, необходимо как для устойчивого поддержания недифференцированного состояния клеток, так и для реализации четкой программы дифференцировки в конкретном направлении [97, 99, 100, 103]. Поддержание плюрипотентности и/или направление дифференцировки клеток, вероятно, зависит от стехиометрических соотношений молекул различных факторов. Эту гипотезу подтверждают экспериментальные данные по разнонаправленной дифференцировке ЭСК, зависящей от уровня транскрипции генов *Oct4*, *Nanog* и *Sox2* [58, 83, 109].

В-четвертых, NANOG через своих партнеров может взаимодействовать с множеством белков, задействованных в эпигенетической регуляции экспрессии генов. Белок NANOG путем взаимодействия с OCT4, DAX1, NAC1, ZFP281 или SALL1/4 может образовывать комплексы с компонентами комплекса NuRD (P66B и HDAC2), обладающего гистон-деацетилазной активностью, белками группы Polycomb (YY1, RNF2 и RYBP) и компонентами ремоделирующего хроматин комплекса SWI/SNF (BAF155) [105]. Во взаимодействии NAC1 и SALL1 с деацетилазами гистонов было экспериментально доказано в более ранних работах [110, 111].

Комплексы NANOG с другими белками, по-видимому, являются функциональными, а не случайными существующими короткое время и выявленными в конкретном эксперименте. Например, показано, что комплекс NAC1, ZFP281 и NANOG взаимодействует с промотором гена *Gata6*, который является маркером энтодермальной дифференцировки, вероятно, подавляя его.

Взаимодействие транскрипционного фактора OCT4 с другими белковыми молекулами также было описано ранее в целом ряде работ [85, 112–114]. В данных работах в основном описываются взаимодействия OCT4 с транскрипционными факторами, необходимые для регуляции транскрипции генов-мишеней в виде гетеродимеров. Кроме того, с использованием дрожжевой двугибридной системы и коиммунопреципитации были найдены белки, взаимодействующие с OCT4 и оказывающие на него ингибирующее действие [115]. Показано, что с OCT4 взаимодействует SUMO-лигаза PIASy, а также белки PIAS1 и PIAS3, относящиеся к тому же семейству. Несмотря на то что PIASy является известной SUMO-лигазой и белок OCT4 содержит сайты сумоилирования, было экспериментально установлено, что ее ингибирующее действие не зависит от данной

активности. PIASy оказывает подавляющее действие на трансаKTивационную способность OCT4, действующего в виде мономера, гомо- или гетеродимера, в то время как PIAS1 и PIAS3 не обладают такой функцией. Кроме того, белки PIASy, PIAS1 и PIAS3 вызывают релокализацию OCT4, перемещая его на периферию ядра [115].

Недавно двумя группами исследователей было проведено исследование паттерна белок-белковых взаимодействий фактора OCT4, а также его известных партнеров: SALL4, TCF2L1, DAX1 и ESRRB – в ЭСК мыши [107, 108]. В своих исследованиях авторы также использовали подход, основанный на экспрессии химерного белка (в данном случае OCT4), содержащего известные эпитопы, необходимые для выделения его комплексов с другими белками из клеточного или ядерного экстракта. В одной из работ использовалась экспрессия *Oct4* под его естественным промотором [107]. Как и в работе Ванга с соавторами [105], среди белков, взаимодействующих с OCT4, обнаружены компоненты комплексов NuRD, SWI/SNF и PRC1, участвующие в регуляции структуры хроматина [107, 108]. Кроме того, в комплексах OCT4 обнаружены отдельные ферменты, принимающие участие в эпигенетической регуляции экспрессии генов, такие, как MYST2 (гистон-ацетилтрансфераза H4), DNMT3A (*de novo* ДНК-метилтрансфераза) и другие. Обнаружены также белки, участвующие в посттрансляционной модификации самого OCT4, например OTG, фермент, присоединяющий O-связанный N-ацетилглюкозамин, который модифицирует OCT4 в ЭСК человека [107, 108, 116]. Среди партнеров OCT4 также выявлены транскрипционные факторы, необходимые для поддержания самообновления ЭСК, такие, как KLF4, SOX2, SALL4 и ZFP281. Анализ функций партнеров OCT4 с помощью информации, представленной в базах данных, показал, что значительная их часть вовлечена в процессы раннего развития и дифференцировки клеток и их нокаут вызывает гибель во время раннего развития эмбриона [107]. Все гены, определенные как партнеры OCT4 в ЭСК мыши, имеют гомологи у человека. Более того, аминокислотные последовательности белков, кодируемых данными генами, имеют очень высокую (около 94%, средняя гомология на уровне геномов 77%) гомологию между мышью и человеком. У человека эти гены тесно связаны с развитием наследственных заболеваний (в основном с нарушением развития) и раковыми заболеваниями [107].

Таким образом, регуляция генов, направленная на поддержание самообновления и плюрипотентности, является более комплексным процессом, чем представлялось ранее. В регуляции задействованы не просто подавление или активация генов-мишеней

отдельными белковыми молекулами транскрипционных факторов. В регуляции принимают участие комплексы молекул, в которые, помимо транскрипционных факторов, могут входить белки, меняющие структуру хроматина. Количественное соотношение молекул в каждой отдельной клетке может непосредственно или опосредованно влиять на самообновление и направление дифференцировки.

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ КЛЕТОК

ЭСК обладают практически неограниченным потенциалом к самообновлению и дифференцировке в самый широкий спектр клеточных типов. При дифференцировке клеток происходит глобальное изменение морфологии, физиологии, скорости деления клеток и других параметров. Данные изменения обусловлены и сопровождаются глобальной сменой паттерна экспрессии генов. В настоящий момент известно, что экспрессия генов жестко регулируется на эпигенетическом уровне. Эпигенетическая регуляция включает в себя ковалентные модификации гистонов (белков, образующих нуклеосомы) и метилирование ДНК промоторных областей генов. Известно множество видов модификаций гистонов, заключающихся в присоединении химических групп и регуляторных пептидов (убиквитин, SUMO) к аминокислотам в составе молекул гистонов, например ацетилирование, метилирование, фосфорилирование, убиквитинилирование и др. Модификации гистонов меняют физические свойства нуклеосом, делая хроматин более или менее доступным для факторов, обеспечивающих транскрипцию генов. Выделяют модификации, ассоциированные с активным хроматином и активно транскрибирующимися генами, и модификации, ассоциированные с неактивным хроматином и чаще всего связанные с подавлением транскрипции. К «активным» модификациям, в частности, относятся ацетилированные формы гистонов H3 и H4, а также триметилированный гистон H3 в положении K4 (H3K4me3) (K – аминокислота лизин согласно однобуквенной номенклатуре). «Неактивными» модификациями хроматина являются метилирование гистона H3 в положении K9 (H3K9me2 и H3K9me3) и ди- и триметилирование гистона H3 в положении K27 (H3K27me2 и H3K27me3). Кроме того, «неактивный» хроматин характеризуется деацетилированием гистонов.

При метилировании ДНК у млекопитающих модификации подвергаются цитозины в пределах CpG-динуклеотидов. Наличие скоплений, или «островков», CpG-динуклеотидов часто наблюдается в промоторных областях генов, и их гиперметилирование чаще всего связано с подавлением транскрипции.

Исследования по локализации модифицированных форм гистонов в геномах эмбриональных стволовых клеток показывают, что распределение активных и неактивных модификаций является довольно необычным и специфичным для плюрипотентных клеток.

Так, в геномах ЭСК мышцы было показано наличие бивалентных доменов, одновременно содержащих метки активного и неактивного хроматина (H3K4me3 и H3K27me3) [117]. Анализ распределения активной и неактивной модификаций гистона H3 осуществлялся в пределах 56 областей, обогащенных высококонсервативными некодирующими последовательностями (ВКНП). Области, богатые ВКНП, относительно бедны генами, однако в них содержится сравнительно большое число генов, кодирующих транскрипционные факторы, которые участвуют в регуляции развития. Например, в данных областях расположены все четыре кластера генов семейства НОХ. В работе Бернтейна с соавторами [117] в пределах ВКНП было обнаружено 343 области обогащения H3K4me3 со средним размером 3.4 т.п.н., 63% которых соколлализуются с точками старта транскрипции известных генов. Кроме того, в ВКНП были обнаружены 192 области обогащения H3K27me3, которые имели максимальный размер 18 т.п.н. в кластерах генов семейства НОХ. Сравнение данных по распределению H3K4me3 и H3K27me3 выявило домены, содержащие обе модификации. В кластерах НОХ обнаружено 9 подобных доменов, в других обогащенных ВКНП областях – 95, в контрольных локусах идентифицировали только 5 бивалентных доменов [117].

Большинство бивалентных доменов обогащенных ВКНП областей ассоциированы с точками начала транскрипции генов, кодирующих транскрипционные факторы. Данные гены входят в состав семейств SOX, FOX, PAX, IRX и POU, отдельные члены которых играют важные роли в дифференцировке клеток в развитии. 26 бивалентных доменов обнаружено вне точек старта транскрипции генов, однако они также ассоциированы с участвующими в развитии генами. Например, бивалентные домены обнаружены в 3'-областях генов *Npas3*, *Meis2*, *Pax2* и *Wnt8b*. Бивалентные домены выявлены в пределах генов, не кодирующих транскрипционные факторы, однако участвующих в развитии нервной системы – *Fgf8* и *Prok1* [117].

В исследованных авторами дифференцированных клетках: эмбриональных фибробластах, первичных фибробластах легкого, миобластиках C2C12 и клетках линии нейробластомы Neuro2a – было обнаружено крайне небольшое число бивалентных доменов. В то же время обнаружены протяженные районы, обогащенные H3K4me3 или H3K27me3 по отдель-

ности. Среди бивалентных доменов, определенных в ЭСК мышцы, в дифференцированных клетках подавляющее большинство доменов содержат протяженные области, представленные только одной из изученных модификаций в зависимости от типа клеток [117].

Гены, точки старта транскрипции которых ассоциированы с бивалентными доменами, характеризуются низким уровнем транскрипции, несмотря на наличие метки активного хроматина H3K4me3, что говорит о «доминировании» H3K27me3 по отношению к H3K4me3. Авторы изучили распределение модификаций в бивалентных доменах, ассоциированных с точками старта транскрипции генов при направленной дифференцировке ЭСК в предшественники нейральных клеток. Оказалось, что гены, транскрибирующиеся после дифференцировки на высоком уровне, теряли модификацию H3K27me3, гены, транскрибирующиеся на низком уровне, увеличивали обогащение H3K4me3, сохраняя H3K27me3, а нетранскрибирующиеся гены сохраняли H3K27me3 и теряли H3K4me3 [117].

Таким образом, в ЭСК существует специфическая система эпигенетической регуляции генов, задействованных в дифференцировке клеток. По всей видимости, она позволяет плюрипотентным клеткам сохранять определенные гены в состоянии «низкого старта» и быстро запускать их транскрипцию в зависимости от программы дифференцировки и типа образующихся дифференцированных клеток.

Молекулярные механизмы, которые лежат в основе эпигенетической регуляции экспрессии генов в ЭСК, активно изучаются. Одними из основных участников системы эпигенетической регуляции в эмбриональном развитии организмов и ЭСК являются белки группы Polycomb [118]. Многочисленные биохимические и генетические исследования показывают, что белки группы Polycomb образуют два независимых комплекса: PRC (Polycomb repressive complex) 1 и PRC2. Основные компоненты данных комплексов проявляют большую эволюционную консервативность и необходимы для нормального эмбрионального развития различных организмов от дрозофилы до мыши и человека [118–122].

В работе Бойер с соавторами был проведен анализ локализации основных компонентов комплексов PRC1 (PHC1, RNF2) и PRC2 (SUZ12, EED) в областях, фланкирующих точки старта транскрипции (от -8 до +1 т.п.н) около 16 тыс. генов в ЭСК мышцы [123]. Авторы данной работы обнаружили, что белки PRC1 и PRC2 в основном локализируются в пределах 1 т.п.н от точек старта транскрипции 512 генов, что может говорить об их участии в регуляции данных генов. Ранее было показано, что PRC2 отвеча-

ет за установление маркера неактивного хроматина H3K27me3. Исследование показало, что все 512 генов, в 5'-областях которых локализуются белки PRC1 и PRC2, имеют обогащение H3K27me3. Среди них значительную долю занимают гены, кодирующие содержащие гомеодомен транскрипционные факторы. Сюда относятся и ранее известные мишени белков группы Polycomb – факторы из семейства HOX и другие транскрипционные факторы из таких семейств, как DLX, IRX, LHX, POU, PAX и SIX. Общей чертой факторов, относящихся к данным семействам, является их участие в процессах дифференцировки клеток, регуляции эмбрионального развития и органогенеза. Кроме того, были выявлены гены, продукты которых хотя и не содержали гомеодомен, также были вовлечены в регуляцию развития. Это белки из семейств FOX, SOX, GATA и TBX. В клетках, гомозиготных по мутации EED (одного из компонентов PRC2), наблюдается повышение экспрессии генов, относящихся к различным семействам, которые подвергаются сайленсингу в ЭСК без мутации [123].

Таким образом, было показано, что в ЭСК мыши множество генов, участвующих в дифференцировке и эмбриональном развитии, являются мишенями для PRC. Следовательно, PRC1 и PRC2 могут играть существенную роль в поддержании самообновления и плюрипотентности ЭСК.

Схожие результаты были получены в работе по локализации белка SUZ12 (еще одного компонента PRC2) в геноме ЭСК человека [124]. Авторам этой работы также удалось показать, что компоненты PRC2 локализуются вблизи точек старта транскрипции генов, вовлеченных в многочисленные процессы, связанные с дифференцировкой клеток во время эмбрионального развития. Кроме того, в ЭСК человека белок SUZ12 был локализован в промоторах генов, кодирующих белки, которые являются компонентами сигнальных путей, задействованных в процессах гастрюляции, дифференцировки в онтогенезе, а также в процессах самообновления и дифференцировки ЭСК в культуре. Среди данных генов встречаются компоненты сигнальных путей, запускаемых TGF β , BMP, WNT, FGF. SUZ12 локализован как в отдельных промоторных областях, так и в довольно протяженных участках, захватывающих несколько генов, являющихся компонентами одного сигнального пути, например WNT (WNT1, WNT2, WNT6) и TGF β (BMP2, GDF6). Ранее было показано, что данные сигнальные пути участвуют в регуляции самообновления и плюрипотентности ЭСК мыши и человека [46]. Следовательно, PRC2, регулируя компоненты этих сигнальных путей, может непосредственно влиять на свойства ЭСК. Одна-

ко позже были получены данные, согласно которым ЭСК мыши, мутантные по EED, сохраняют плюрипотентность [125]. ЭСК, гомозиготные по мутации EED, экспрессируют транскрипционные факторы OCT4 и NANOG, а также образуют химеры. Хотя в данной работе взрослых химерных животных получено не было, высокая степень химеризации наблюдалась в 12.5-дневных эмбрионах. Попытка получить культуру эмбриональных фибробластов, являющихся производными мутантных ЭСК, потерпела неудачу, по-видимому, вследствие низкой жизнеспособности дифференцированных мутантных клеток. Химерные эмбрионы (с большим процентом химеризации) также имели ряд дефектов: гипертрофированный аллантаис, недоразвитую нейроэктодерму и эмбриональную мезодерму, что, вероятно, являлось причиной эмбриональной гибели на стадии около 10.5 дней после оплодотворения [125].

Одной из интересных закономерностей, описанных в работе Ли с соавторами [124], является высокая частота солокализации SUZ12 с уже упоминавшимися ранее высококонсервативными некодирующими последовательностями (ВКНП), в зонах обогащения которыми локализованы бивалентные хроматиновые домены. Примерно 8% из ранее обнаруженных 14 тыс. ВКНП [126] содержат обогащение SUZ12, причем, чем выше эволюционная консервативность элемента, тем выше степень обогащения [124].

Кроме того, было обнаружено, что одна треть генов, регулирующих развитие и связывающихся с PRC2, также регулируется хотя бы одним из трех транскрипционных факторов OCT4, SOX2 или NANOG, являющихся ключевыми в системе поддержания плюрипотентности ЭСК человека и мыши [22, 124]. Это гены, вовлеченные в развитие экстраэмбриональных тканей, а также экто-, мезо- и энтодермы (например, *ESX1L*, *ONECUT1*, *HAND1* и *HOXB1*). Транскрипционные факторы, входящие в систему поддержания плюрипотентности, могут напрямую регулировать гены, кодирующие компоненты PRC2. Так, показано, что транскрипционные факторы OCT4 и STAT3 (его активность зависит от присутствия интерлейкина LIF) позитивно регулируют ген *Eed* в ЭСК мыши [127]. В то же время установлено, что в ЭСК мыши транскрипционный фактор OCT4 негативно регулирует ген *Hdac4*, кодирующий гистондеацетилазу [128]. Эти факты являются примерами совместной работы системы эпигенетической регуляции экспрессии генов и системы поддержания плюрипотентности в ЭСК.

Гены, участвующие в поддержании плюрипотентности и самообновления ЭСК, подвергаются эпигенетическим изменениям во время дифференцировки в эмбриогенезе и при индуцированной или спонтанной дифференцировке *in vitro*. Ген *Oct4*

несколько выделяется в ряду остальных генов (*Dppa3/Stella/PGC7, Nanog* и *Sox2*), экспрессия которых характерна для плюрипотентных клеток, по механизму эпигенетического сайленсинга при дифференцировке [129]. В дифференцированных клетках эмбриональной карциномы P19 и постимплантационных эмбрионах мыши для промоторной области *Oct4* характерно наличие меток неактивного хроматина: метилированного H3K9 и гетерохроматинового белка HP1. Такой же тип эпигенетического сайленсинга наблюдается у гена *Rex1*, транскрипция которого позитивно регулируется транскрипционным фактором OCT4 (для генов *Nanog* и *Sox2* такого механизма не выявлено). Наличие H3K9me и HP1 способствует привлечению *de novo* ДНК-метилтрансфераз DNMT3A и DNMT3B, которые производят метилирование ДНК в промоторном районе гена *Oct4*, что необходимо для полного и стабильного подавления транскрипции. То, что метилирование ДНК является вторичным процессом по отношению к метилированию H3K9, было доказано при исследовании дифференцировки ЭСК мыши, гомозиготных по мутациям генов, кодирующих гистон-метилтрансферазу G9a, и генов *Dnmt3a, Dnmt3b*, кодирующих ДНК-метилтрансферазы. Также было показано, что мутации, нарушающие метилирование H3K9 и метилирование ДНК, способствуют подавлению способности ЭСК к дифференцировке [129].

Недавно было установлено, что белки эухроматина также необходимы для поддержания плюрипотентности ЭСК мыши [130]. Репрессия транскрипции гена *Chd1* подавляет рост клеточной культуры ЭСК и активность промотора гена *Oct4*. Данный ген кодирует эухроматиновый белок, который локализуется с меткой активного хроматина - H3K4me3 и РНК-полимеразой II в ЭСК мыши. Подавление транскрипции *Chd1* приводит к повышению экспрессии нейтральных маркеров в ЭСК, а также к нарушению дифференцировки клеток в примитивную энтодерму и, как следствие, в мезодермальные кардиальные производные. При этом дифференцировка по эктодермальному типу происходит нормально. Кроме того, обнаружено, что подавление *Chd1* резко снижает эффективность получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток из эмбриональных фибробластов [130]. Следует отметить, что в ЭСК в пределах гена *Chd1* локализуются транскрипционные факторы, необходимые для поддержания плюрипотентности клеток, таких, как OCT4, SOX2, NANOG, SMAD1, ZFX и E2F1 [131].

Связь плюрипотентности с эпигенетическими механизмами прослеживается и в экспериментах по получению индуцированных плюрипотентных стволовых клеток мыши и человека. В нескольких

работах было показано, что использование специфических ингибиторов ферментов, участвующих в эпигенетической модификации гистонов и ДНК, существенно увеличивает эффективность получения ИПСК и даже способно заменить некоторые из «факторов плюрипотентности». В настоящий момент подобные свойства известны для ингибиторов деацетилаз гистонов (вальпроевая кислота (VPA), трихостатин А (TSA) и SAHA (suberoylanilide hydroxamic acid)) [132, 133], ингибитора гистон-метилтрансферазы G9a – VIX-01294 [134, 135], а также ингибиторов ДНК-метилтрансфераз – 5-азациитидина и RG108 [132–136]. Кроме того, было показано, что использование РНК-интерференции против *Dnmt* увеличивает эффективность репрограммирования за счет усиления перехода частично репрограммированных клеток в полностью репрограммированное состояние [136]. Во множестве работ, посвященных получению индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека и животных, показано, что репрограммирование соматических клеток к плюрипотентному состоянию сопровождается деметилированием ДНК в промоторных районах генов *Oct4* и *Nanog*, в то время как в соматических клетках и ТСК мыши они гиперметилированы [137, 138].

МикроРНК и ПЛЮРИПОТЕНТНОСТЬ

Многочисленные исследования показывают, что микроРНК играют важную роль в регуляции экспрессии множества генов во время эмбрионального развития организмов. В частности, показано, что мутация в гене *Dicer*, кодирующем РНКазу, необходимую для процессинга малых некодирующих РНК, вызывает раннюю гибель эмбрионов мыши [139]. Подобный эффект наблюдается также при мутации гена *Dgcr8* (его белковый продукт входит в состав комплекса Microprocessor, который также участвует в биогенезе микроРНК). ЭСК, мутантные по генам *Dicer* и *Dgcr8*, характеризуются нарушениями клеточного цикла и способности к дифференцировке [140–142].

В настоящее время известно более 500 различных микроРНК, экспрессия которых характерна для различных тканей и типов дифференцированных клеток. Существуют семейства микроРНК, экспрессия которых ограничивается недифференцированными ЭСК. Для ЭСК мыши это семейство *mir-290* (*mir-290, mir-291a, mir-291b, mir-292, mir-293, mir-294, mir-295*) и кластер *mir-302* (*mir-302a, mir-302b, mir-302c, mir-302d, mir-367*). Для ЭСК человека характерна экспрессия микроРНК семейства *mir-302*, а также *mir-371* (*mir-371, mir-372, mir-373*), представители которого гомологичны представителям семейства *mir-290* мыши [143].

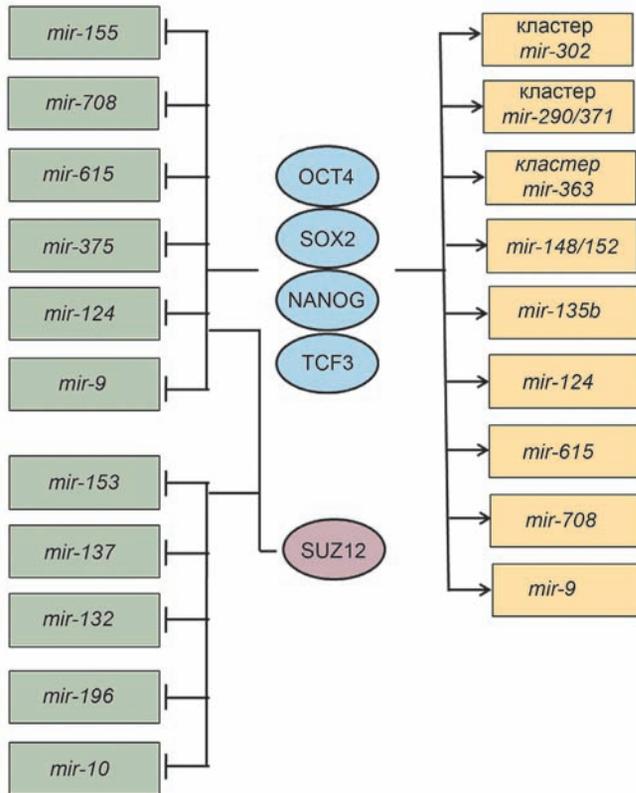


Рис. 3. Гены микроРНК, ассоциированные с транскрипционными факторами OCT4, SOX2, NANOG и TCF3 (показаны стрелками), также совместно регулируемые данными факторами и PRC1 (SUZ12) в эмбриональных стволовых клетках мыши и человека [143].

На сегодняшний день имеется множество экспериментальных доказательств того, что система регуляции экспрессии генов, опосредованная микроРНК, и система транскрипционных факторов плюрипотентности, включающая OCT4, NANOG, SOX2 и др., тесно связаны между собой. Транскрипционные факторы могут регулировать транскрипцию отдельных генов и целых кластеров микроРНК, в то же время микроРНК способны регулировать экспрессию *Oct4*, *Nanog* и *Sox2* на посттранскрипционном уровне [22, 23, 143]. Например, показано, что *mir-134*, *mir-296* и *mir-470*, экспрессия которых повышается при индуцированной дифференцировке ЭСК мыши, могут в разных комбинациях регулировать *Oct4*, *Nanog* и *Sox2*, вызывая снижение уровня соответствующих белков [144]. Повышение уровня транскрипции одной *mir-134* может вызывать дифференцировку ЭСК мыши по эктодермальному пути. Мишенями *mir-134* являются мРНК генов *Nanog* и *LRH1*, белковые продукты которых позитивно регулируют ген *Oct4* [145].

Позже было показано, что в ЭСК мыши микроРНК *mir-200c*, *mir-203* и *mir-183* способны совместно репрессировать *Sox2* и *Klf4*, которые также необходимы для поддержания плюрипотентности [146]. Индукция данной микроРНК вызывает снижение способности клеток к самообновлению и индукцию маркеров дифференцировки. Для ЭСК человека также обнаружена микроРНК, активация которой вызывает дифференцировку, – это *mir-145*. В недифференцированных ЭСК человека транскрипция *mir-145* репрессирована транскрипционным фактором OCT4 [147].

Локализация транскрипционных факторов в геномах ЭСК человека и мыши показала, что гены, кодирующие микроРНК, выявляются среди мишеней OCT4, SOX2 и NANOG [22, 23].

Высокоточное картирование распределения транскрипционных факторов OCT4, SOX2, NANOG и TCF3 в ЭСК мыши показало, что данные транскрипционные факторы локализируются в пределах 55 локусов микроРНК, включая три полицистронных кластера, что составляет 20% всех аннотированных микроРНК млекопитающих [143]. Среди этих микроРНК есть как активно транскрибирующиеся в ЭСК, так и молчащие. Следовательно, транскрипционные факторы плюрипотентности могут выступать как активаторы, так и репрессоры транскрипции микроРНК в ЭСК. В промоторных областях генов микроРНК, репрессированных OCT4, SOX2, NANOG и TCF3, кроме того, обнаружены белки группы Polysomb, производящие ди- и триметилирование гистона H3 в положении K27 (метка неактивного хроматина) (*рис. 3*). При дифференцировке клеток происходит перестройка транскрипции, в результате которой в каждом из типов дифференцированных клеток формируется специфический паттерн экспрессии микроРНК [143].

По всей видимости, микроРНК могут играть роль и при репрограммировании клеток. Было показано, что ЭСК-специфичные микроРНК *mir-291-3p*, *mir-294* и *mir-295* могут повышать эффективность получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток мыши без использования гена *c-Myc* [148]. Кроме того, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека были успешно получены с использованием эктопической экспрессии генов OCT4, SOX2, KLF4 и LIN28. Белковый продукт гена LIN28 является ингибитором продукции микроРНК семейства let-7, которые участвуют в дифференцировке клеток [149].

ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ OCT4, SOX2 И NANOG И ИНАКТИВАЦИЯ X-ХРОМОСОМЫ

Система поддержания плюрипотентности и самообновления клеток, центральное место в которой занимают транскрипционные факторы OCT4, SOX2

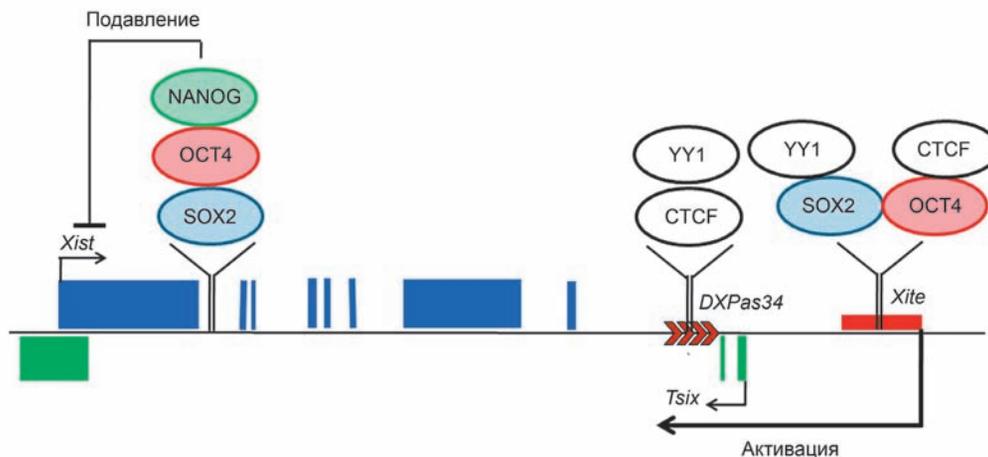


Рис. 4. Схема локуса *Xist/Tsix* мыши с расположением сайтов транскрипционных факторов OCT4, SOX2 и NANOG, а также взаимодействующих с ними белков YY1 и CTCF. Синими прямоугольниками показаны экзоны гена *Xist*, зелеными прямоугольниками – экзоны *Tsix*. Красным прямоугольником обозначен энхансер *Xite*. Стрелками показаны направления транскрипции генов.

и NANOG, имеет связь с фундаментальными генетическими процессами, происходящими в раннем эмбриогенезе млекопитающих, например с процессом инактивации X-хромосомы.

У самок высших млекопитающих одна из двух генетически эквивалентных X-хромосом подвергается инактивации, что выражается в гетерохроматизации и транскрипционном молчании большинства ее генов. Процесс инактивации состоит из нескольких стадий и управляется сложным генетическим локусом – центром инактивации, расположенным на X-хромосоме [150]. Во время самых ранних стадий развития во всех бластомерах эмбрионов мыши наблюдается импринтированная инактивация, т.е. инактивации подвергается исключительно X-хромосома, унаследованная от самца. После отделения плюрипотентного компартамента бластоцисты – ВКМ, в ней происходит реактивация инактивированной X-хромосомы. После имплантации импринтированная инактивация сохраняется в экстраэмбриональных тканях, в то время как в клетках эпибласта при дифференцировке устанавливается случайная инактивация X-хромосомы. Ключевую роль в процессе инактивации играют два гена центра инактивации: *Xist* и *Tsix*, которые транскрибируются антипараллельно с комплементарных цепей ДНК [151–153] (рис. 4). Оба гена кодируют не-транслируемые ядерные РНК. РНК гена *Xist* распространяется вдоль X-хромосомы, запуская инактивацию. Транскрипция *Tsix* оказывает подавляющее действие на транскрипцию гена *Xist* [152].

В ЭСК, как и в клетках ВКМ, обе X-хромосомы активны, уровень мРНК гена *Xist* в них крайне низок [154]. С помощью флуоресцентной *in situ*-гибридизации транскрипт *Xist* выявляется в виде точечного сигнала на обеих X-хромосомах. Во время дифференцировки ЭСК происходит случайная инактивация одной из родительских X-хромосом, так же

как и в клетках эпибласта эмбрионов после имплантации в матку. Таким образом, очевидно, что существует корреляция между плюрипотентностью и инактивацией X-хромосом в клетках самок. Молекулярная природа данной корреляции была до недавнего времени не выяснена.

Недавно была обнаружена связь между транскрипционными факторами OCT4, SOX2 и NANOG, играющими ключевую роль в поддержании плюрипотентности ЭСК, и инактивацией X-хромосомы [155]. Показано, что белки OCT4, SOX2 и NANOG совместно связываются с участком ДНК в первом интроне гена *Xist*, подавляя его транскрипцию в недифференцированных ЭСК мыши (рис. 4). В ЭСК, гомозиготных по мутации гена *Nanog*, при нормальном связывании белков OCT4 и SOX2 с первым интроном *Xist* наблюдается обратимая, ограниченная активация гена *Xist*. В то же время репрессия всех трех факторов OCT4, SOX2 и NANOG сопровождается быстрой аккумуляцией РНК *Xist* в ядрах ЭСК. Таким образом факторы плюрипотентности могут напрямую репрессировать ген *Xist* по *Tsix*-независимому механизму.

Однако позднее было показано, что транскрипционные факторы OCT4 и SOX2 могут принимать участие в регуляции гена *Xist*, активируя транскрипцию его репрессоров – *Tsix* и *Xite* [156] (рис. 4). Использование биоинформационного анализа выявило один сайт посадки транскрипционного фактора SOX2 и два сайта посадки фактора OCT4 в центре инактивации X-хромосомы мыши. Один из сайтов OCT4 расположен в непосредственной близости к сайтам посадки факторов CTCF и YY1 (Сайт E) на расстоянии 1 т.п.н. от регуляторного элемента *DXPas34*, который также содержит несколько сайтов посадки CTCF и YY1 (Сайт D). Композиционный сайт посадки транскрипционных факторов OCT4 и SOX2 был обнаружен в пределах области размером 1.2 т.п.н., кото-

рая известна как энхансер *Xite* (рис. 4). Факт связывания фактора OCT4 с последовательностью сайта E, а также факторов OCT4 и SOX2 с нуклеотидной последовательностью *Xite* подтвержден *in vitro* с помощью гель-ретардации и *in vivo* методом иммунопреципитации хроматина. Было показано, что область энхансера *Xite*, содержащая нативные сайты OCT4 и SOX2, способна существенно повышать активность мажорного промотора гена *Tsix* в составе люциферазных репортерных конструкций, временно трансфицированных в ЭСК мыши. Мутация сайтов OCT4 и SOX2 существенно снижала способность энхансера *Xite* активировать промотор *Tsix*. Подавление экспрессии гена *Oct4* с помощью РНК-интерференции вызывало существенное снижение уровня РНК *Tsix* и *Xite* в ЭСК самок мыши. В то же время подавление экспрессии *Sox2* даже немного повышало уровень РНК *Tsix/Xite*. По всей видимости, транскрипционный фактор SOX2 играет гораздо менее существенную роль в трансактивации *Tsix*, чем OCT4.

Кроме взаимодействий белок–ДНК, OCT4 и SOX2 характеризуются и белок–белковыми взаимодействиями, которые напрямую связаны с процессом инактивации X-хромосомы. Транскрипционный фактор OCT4 взаимодействует с белком CTCF, в то время как SOX2 – с белком YY1 (рис. 4). Ранее было показано, что CTCF и его кофактор YY1 участвуют в сближении X-хромосом на стадиях подсчета и выбора будущей неактивной хромосомы. Подавление экспрессии *Oct4* в ЭСК мыши нарушает сближение X-хромосом так же, как это наблюдается при репрессии *Ctcf*, тогда как снижение уровня экспрессии *Sox2* не оказывает существенного влияния на данный процесс. При образовании эмбрионидных телц из ЭСК с подавленной экспрессией *Oct4* наблюдалась аберрантная, биаллельная экспрессия *Xist*, что могло быть вызвано нарушением процесса подсчета X-хромосом. Биаллельная экспрессия *Xist* не наблюдалась при подавлении экспрессии *Ctcf* и *Sox2* [156].

Если принимать во внимание результаты двух вышеописанных работ, можно предположить, что транскрипционный фактор OCT4 регулирует ген *Xist* двумя путями: напрямую репрессируя транскрипцию *Xist*, совместно с факторами SOX2 и NANOG, а также путем активации гена *Tsix*. Во время дифференцировки клеток фактор OCT4 в кооперации с CTCF опосредует нормальное спаривание X-хромосом в области *Tsix/Xite*, обеспечивая подсчет и выбор активной и неактивной хромосомы. Снижение уровня транскрипции гена *Oct4* вызывает потерю связывания фактора OCT4 на одной из X-хромосом, репрессию *Tsix* и активацию *Xist*, именно эта хромосома становится неактивной. На будущей активной X-хромосоме остаточное количество белка OCT4 по-

прежнему поддерживает экспрессию *Tsix* и репрессию *Xist*. Данная модель, безусловно, очень элегантно представляет связь между плюрипотентностью и статусом X-хромосом в клетках самок млекопитающих. Однако по-прежнему остается невыясненным ряд вопросов. Например, вопрос о том, как достигается разница в силе связывания или количестве белков OCT4, SOX2 и NANOG на будущих активной и неактивной X-хромосомах во время дифференцировки. Логично предположить, что при случайной инактивации X-хромосомы это тоже происходит случайно. Но как тогда быть с импринтированной инактивацией, когда инактивации подвергается только X-хромосома, пришедшая от самца? Активная и неактивная X-хромосомы генетически эквивалентны, т.е. разница в связывании белков не может объясняться различием в нуклеотидной последовательности. Очевидно, что необходим поиск дополнительных белковых молекул или эпигенетических факторов, которые могут модулировать данный процесс.

Другой интересный вопрос связан со статусом X-хромосомы в ЭСК человека. Первая полученная линия ЭСК человека (H9) имела две активные X-хромосомы, как это наблюдается в ЭСК мыши [15, 157], транскрипция гена *XIST* в данных клетках не детектировалась. Во время дифференцировки H9 наблюдалась случайная инактивация одной из X-хромосом и повышение экспрессии *XIST*. Однако позже было установлено, что отдельные субклоны H9 могут экспрессировать *XIST*, РНК которого покрывает неактивную хромосому даже в недифференцированных клетках [158]. Кроме того, были обнаружены другие линии ЭСК человека, экспрессирующие *XIST* и несущие неактивную X-хромосому [157–159]. По данным международного консорциума по стволовым клеткам, около половины из проанализированных линий ЭСК, полученных в разных лабораториях, экспрессируют ген *XIST* одновременно с маркерами плюрипотентного состояния, такими, как OCT4, SOX2 и NANOG [159]. Анализ одиннадцати линий ЭСК человека, проведенный Сильва с соавторами [160], позволил разделить ЭСК на три группы: 1) клетки, имеющие две активные X-хромосомы, одна из которых инактивируется в процессе дифференцировки; 2) клетки, имеющие одну неактивную хромосому в недифференцированном и дифференцированном состоянии; 3) клетки, не экспрессирующие *XIST* в недифференцированном и дифференцированном состоянии [160]. Последующие эксперименты показали, что, несмотря на отсутствие транскрипции *XIST*, клетки третьей группы имеют неактивную X-хромосому [160]. Все приведенные выше примеры говорят о том, что у человека транскрипция *XIST* и инактивация X-хромосомы все-таки не связаны на-

прямую с плюрипотентностью и действием факторов OCT4, SOX2 и NANOG.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эмбриональные стволовые клетки являются уникальным объектом фундаментальных и прикладных исследований. Их уникальность основана на двух свойствах – самообновлении и плюрипотентности. Современные методы клеточной биологии и молекулярно-генетического анализа позволили по-новому взглянуть на молекулярные основы и факторы, контролирующие самообновление и плюрипотентность. Было установлено, что основные свойства эмбриональных стволовых клеток контролируются

сложной, многокомпонентной системой, включающей транскрипционные факторы, сигнальные каскады, а также систему эпигенетической регуляции и микроРНК. Безусловно, полученные знания помогут понять природу многих процессов, происходящих в эмбриогенезе животных и человека. Кроме того, новые знания позволят полнее использовать ЭСК в прикладных исследованиях, понять причины многих наследственных заболеваний человека и, возможно, разработать методы их лечения. ●

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Surani M.A., Hayashi K., Hajkova P. // Cell. 2007. V. 128. P. 747–762.
2. Jaenisch R., Young R. // Cell. 2008. V. 132. P. 567–582.
3. Durcova-Hills G., Ainscough J., McLaren A. // Differentiation. 2001. V. 68. P. 220–226.
4. McLaren A., Durcova-Hills G. // Reprod. Fertil. Dev. 2001. V. 13. P. 661–664.
5. Tesar P.J., Chenoweth J.G., Brook F.A., et al. // Nature. 2007. V. 448. P. 196–199.
6. Takahashi K., Yamanaka S. // Cell. 2006. V. 126. P. 663–676.
7. Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., et al. // Cell. 2007. V. 131. P. 861–872.
8. Wernig M., Meissner A., Foreman R., et al. // Nature. 2007. V. 448. P. 318–324.
9. Johnson M.H., Ziomek C.A. // Cell. 1981. V. 24. P. 71–80.
10. Zernicka-Goetz M. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2005. V. 6. P. 919–928.
11. Rossant J. // Cell. 2009. V. 138. P. 1047–1050.
12. Evans M.J., Kaufman M.H. // Nature. 1981. V. 292. P. 154–156.
13. Martin G.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. P. 7634–7638.
14. Thomson A., Wajtacha D., Hewitt Z., et al. // Cloning Stem Cells. 2008. V. 10. P. 89–106.
15. Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., et al. // Science. 1998. V. 282. P. 1145–1147.
16. Tanaka S., Kunath T., Hadjantonakis A.K., et al. // Science. 1998. V. 282. P. 2072–2075.
17. Kunath T., Arnaud D., Uy G.D., et al. // Development. 2005. V. 132. P. 1649–1661.
18. Shevchenko A.I., Demina V.V., Mazurok N.A., et al. // Rus. J. Genetics. 2008. V. 44. P. 1280–1289.
19. Xu R.H., Chen X., Li D.S., et al. // Nat. Biotechnol. 2002. V. 20. P. 1261–1264.
20. Xu R.H., Peck R.M., Li D.S., et al. // Nat. Methods. 2005. V. 2. P. 185–190.
21. Humphrey R.K., Beattie G.M., Lopez A.D., et al. // Stem Cells. 2004. V. 22. P. 522–530.
22. Boyer L.A., Lee T.I., Cole M.F., et al. // Cell. 2005. V. 122. P. 947–956.
23. Loh Y.H., Wu Q., Chew J.L., et al. // Nat. Genet. 2006. V. 38. P. 431–440.
24. Niwa H., Ogawa K., Shimosato D., Adachi K. // Nature. 2009. V. 460. P. 118–122.
25. Burdon T., Chambers I., Stracey C., et al. // Cells Tissues Organs. 1999. V. 165. P. 131–143.
26. Smith A.G., Heath J.K., Donaldson D.D., et al. // Nature. 1988. V. 336. P. 688–690.
27. Williams R.L., Hilton D.J., Pease S., et al. // Nature. 1988. V. 336. P. 684–687.
28. Niwa H., Burdon T., Chambers I., Smith A. // Genes Dev. 1998. V. 12. P. 2048–2060.
29. Matsuda T., Nakamura T., Nakao K., et al. // EMBO J. 1999. V. 18. P. 4261–4269.
30. Sumi T., Fujimoto Y., Nakatsuji N., Suemori H. // Stem Cells. 2004. V. 22. P. 861–872.
31. Shi Y., Massague J. // Cell. 2003. V. 113. P. 685–700.
32. James D., Levine A.J., Besser D., Hemmati-Brivanlou A. // Development. 2005. V. 132. P. 1273–1282.
33. Vallier L., Reynolds D., Pedersen R.A. // Dev. Biol. 2004. V. 275. P. 403–421.
34. Vallier L., Alexander M., Pedersen R.A. // J. Cell Sci. 2005. V. 118. P. 4495–4509.
35. Assou S., Le Carrour T., Tondeur S., et al. // Stem Cells. 2007. V. 25. P. 961–973.
36. Xiao L., Yuan X., Sharkis S.J. // Stem Cells. 2006. V. 24. P. 1476–1486.
37. Greber B., Lehrach H., Adjaye J. // Stem Cells. 2007. V. 25. P. 455–464.
38. Chen C., Ware S.M., Sato A., et al. // Development. 2006. V. 133. P. 319–329.
39. Levine A.J., Brivanlou A.H. // Cell Cycle. 2006. V. 5. P. 1069–1073.
40. Ying Q.L., Nichols J., Chambers I., Smith A. // Cell. 2003. V. 115. P. 281–292.
41. Amit M., Carpenter M.K., Inokuma M.S., et al. // Dev. Biol. 2000. V. 227. P. 271–278.
42. Hamazaki T., Kehoe S.M., Nakano T., Terada N. // Mol. Cell Biol. 2006. V. 26. P. 7539–7549.
43. Dvorak P., Dvorakova D., Koskova S., et al. // Stem Cells. 2005. V. 23. P. 1200–1211.
44. Dvorak P., Hampl A. // Folia Histochem. Cytobiol. 2005. V. 43. P. 203–208.
45. Aubert J., Dunstan H., Chambers I., Smith A. // Nat. Biotechnol. 2002. V. 20. P. 1240–1245.
46. Sato N., Meijer L., Skaltsounis L., et al. // Nat. Med. 2004. V. 10. P. 55–63.
47. Dravid G., Ye Z., Hammond H., et al. // Stem Cells. 2005. V. 23. P. 1489–1501.

48. Lu J., Hou R., Booth C.J., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. P. 5688–5693.
49. Okamoto K., Okazawa H., Okuda A., et al. // *Cell*. 1990. V. 60. P. 461–472.
50. Rosner M.H., Vigano M.A., Ozato K., et al. // *Nature*. 1990. V. 345. P. 686–692.
51. Scholer H.R., Balling R., Hatzopoulos A.K., et al. // *EMBO J*. 1989. V. 8. P. 2551–2557.
52. Palmieri S.L., Peter W., Hess H., Scholer H.R. // *Dev. Biol*. 1994. V. 166. P. 259–267.
53. Nichols J., Zevnik B., Anastassiadis K., et al. // *Cell*. 1998. V. 95. P. 379–391.
54. Kirchhof N., Carnwath J.W., Lemme E., et al. // *Biol. Reprod*. 2000. V. 63. P. 1698–1705.
55. Hansis C., Grifo J.A., Krey L.C. // *Mol. Hum. Reprod*. 2000. V. 6. P. 999–1004.
56. Mitalipov S.M., Kuo H.C., Hennebold J.D., Wolf D.P. // *Biol. Reprod*. 2003. V. 69. P. 1785–1792.
57. Cauffman G., van de Velde H., Liebaers I., van Steirteghem A. // *Mol. Hum. Reprod*. 2005. V. 11. P. 173–181.
58. Niwa H., Miyazaki J., Smith A.G. // *Nat. Genet*. 2000. V. 24. P. 372–376.
59. Kehler J., Tolkunova E., Koschorz B., et al. // *EMBO Rep*. 2004. V. 5. P. 1078–1083.
60. Velkey J.M., O'Shea K.S. // *Genesis*. 2003. V. 37. P. 18–24.
61. Hay D.C., Sutherland L., Clark J., Burdon T. // *Stem Cells*. 2004. V. 22. P. 225–235.
62. Takeda J., Seino S., Bell G.I. // *Nucl. Acids Res*. 1992. V. 20. P. 4613–4620.
63. van Eijk M.J., van Rooijen M.A., Modina S., et al. // *Biol. Reprod*. 1999. V. 60. P. 1093–1103.
64. Nordhoff V., Hubner K., Bauer A., et al. // *Mamm. Genome*. 2001. V. 12. P. 309–317.
65. Medvedev S.P., Shevchenko A.I., Elisaphenko E.A., et al. // *BMC Genomics*. 2008. V. 9. P. 162.
66. Yeom Y.I., Ha H.S., Balling R., et al. // *Mech. Dev*. 1991. V. 35. P. 171–179.
67. Atlasi Y., Mowla S.J., Ziaee S.A., et al. // *Stem Cells*. 2008. V. 26. P. 3068–3074.
68. Lee J., Kim H.K., Rho J.Y., et al. // *J. Biol. Chem*. 2006. V. 281. P. 33554–33565.
69. Cauffman G., Liebaers I., van Steirteghem A., van de Velde H. // *Stem Cells*. 2006. V. 24. P. 2685–2691.
70. Wang X., Zhao Y., Xiao Z., et al. // *Stem Cells*. 2009. V. 27. P. 1265–1275.
71. Wang S.H., Tsai M.S., Chiang M.F., Li H. // *Gene Expr. Patterns*. 2003. V. 3. P. 99–103.
72. Chambers I., Colby D., Robertson M., et al. // *Cell*. 2003. V. 113. P. 643–655.
73. Mitsui K., Tokuzawa Y., Itoh H., et al. // *Cell*. 2003. V. 113. P. 631–642.
74. Hyslop L., Stojkovic M., Armstrong L., et al. // *Stem Cells*. 2005. V. 23. P. 1035–1043.
75. Pan G.J., Pei D.Q. // *Cell Res*. 2003. V. 13. P. 499–502.
76. Pan G., Pei D. // *J. Biol. Chem*. 2005. V. 280. P. 1401–1407.
77. Mullin N.P., Yates A., Rowe A.J., et al. // *Biochem. J*. 2008. V. 411. P. 227–231.
78. Wang J., Levasseur D.N., Orkin S.H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. V. 105. P. 6326–6331.
79. Wang Z., Ma T., Chi X., Pei D. // *J. Biol. Chem*. 2008. V. 283. P. 4480–4489.
80. Medvedev S.P., Elisaphenko E.A., Shevchenko A.I., et al. // *Dokl. Biochem. Biophys*. 2009. V. 425. P. 102–105.
81. Avilion A.A., Nicolis S.K., Pevny L.H., et al. // *Genes Dev*. 2003. V. 17. P. 126–140.
82. Masui S., Nakatake Y., Toyooka Y., et al. // *Nat. Cell Biol*. 2007. V. 9. P. 625–635.
83. Adachi K., Suemori H., Yasuda S.Y., et al. // *Genes Cells*. 2010. V. 15. P. 455–470.
84. Botquin V., Hess H., Fuhrmann G., et al. // *Genes Dev*. 1998. V. 12. P. 2073–2090.
85. Yuan H., Corbi N., Basilico C., Dailey L. // *Genes Dev*. 1995. V. 9. P. 2635–2645.
86. Nishimoto M., Fukushima A., Okuda A., Muramatsu M. // *Mol. Cell. Biol*. 1999. V. 19. P. 5453–5465.
87. Liu L., Roberts R.M. // *J. Biol. Chem*. 1996. V. 271. P. 16683–16689.
88. Liu L., Leaman D., Villalta M., Roberts R.M. // *Mol. Endocrinol*. 1997. V. 11. P. 1651–1658.
89. Pesce M., Scholer H.R. // *Mol. Reprod. Dev*. 2000. V. 55. P. 452–457.
90. Ambrosetti D.C., Basilico C., Dailey L. // *Mol. Cell. Biol*. 1997. V. 17. P. 6321–6329.
91. Tomilin A., Remenyi A., Lins K., et al. // *Cell*. 2000. V. 103. P. 853–864.
92. Remenyi A., Tomilin A., Pohl E., et al. // *Mol. Cell*. 2001. V. 8. P. 569–580.
93. Kang J., Gemberling M., Nakamura M., et al. // *Genes Dev*. 2009. V. 23. P. 208–222.
94. Abeyta M.J., Clark A.T., Rodriguez R.T., et al. // *Hum. Mol. Genet*. 2004. V. 13. P. 601–608.
95. Brandenberger R., Khrebtukova I., Thies R.S., et al. // *BMC Dev. Biol*. 2004. V. 4. P. 10.
96. Catena R., Tiveron C., Ronchi A., et al. // *J. Biol. Chem*. 2004. V. 279. P. 41846–41857.
97. Kuroda T., Tada M., Kubota H., et al. // *Mol. Cell. Biol*. 2005. V. 25. P. 2475–2485.
98. Niwa H. // *Cell Struct. Funct*. 2001. V. 26. P. 137–148.
99. Okumura-Nakanishi S., Saito M., Niwa H., Ishikawa F. // *J. Biol. Chem*. 2005. V. 280. P. 5307–5317.
100. Rodda D.J., Chew J.L., Lim L.H., et al. // *J. Biol. Chem*. 2005. V. 280. P. 24731–24737.
101. Sato N., Sanjuan I.M., Heke M., et al. // *Dev. Biol*. 2003. V. 260. P. 404–413.
102. Wei C.L., Miura T., Robson P., et al. // *Stem Cells*. 2005. V. 23. P. 166–185.
103. Chew J.L., Loh Y.H., Zhang W., et al. // *Mol. Cell. Biol*. 2005. V. 25. P. 6031–6046.
104. Suzuki A., Raya A., Kawakami Y., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. P. 10294–10299.
105. Wang J., Rao S., Chu J., et al. // *Nature*. 2006. V. 444. P. 364–368.
106. Wu Q., Chen X., Zhang J., et al. // *J. Biol. Chem*. 2006. V. 281. P. 24090–24094.
107. Pardo M., Lang B., Yu L., et al. // *Cell Stem Cell*. 2010. V. 6. P. 382–395.
108. van den Berg D.L., Snoek T., Mullin N.P., et al. // *Cell Stem Cell*. 2010. V. 6. P. 369–381.
109. Hatano S.Y., Tada M., Kimura H., et al. // *Mech. Dev*. 2005. V. 122. P. 67–79.
110. Lauberth S.M., Rauchman M. // *J. Biol. Chem*. 2006. V. 281. P. 23922–23931.
111. Korutla L., Wang P.J., Mackler S.A. // *J. Neurochem*. 2005. V. 94. P. 786–793.
112. Tomioka M., Nishimoto M., Miyagi S., et al. // *Nucleic Acids Res*. 2002. V. 30. P. 3202–3213.
113. Brehm A., Ohbo K., Zwerschke W., et al. // *Mol. Cell. Biol*. 1999. V. 19. P. 2635–2643.
114. Guo Y., Costa R., Ramsey H., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. V. 99. P. 3663–3667.

115. Tolkunova E., Malashicheva A., Parfenov V.N., et al. // *J. Mol. Biol.* 2007. V. 374. P. 1200–1212.
116. Webster D.M., Teo C.F., Sun Y., et al. // *BMC Dev. Biol.* 2009. V. 9. P. 28.
117. Bernstein B.E., Mikkelsen T.S., Xie X., et al. // *Cell.* 2006. V. 125. P. 315–326.
118. Ringrose L., Paro R. // *Annu. Rev. Genet.* 2004. V. 38. P. 413–443.
119. O'Carroll D., Erhardt S., Pagani M., et al. // *Mol. Cell. Biol.* 2001. V. 21. P. 4330–4336.
120. Pasini D., Bracken A.P., Jensen M.R., et al. // *EMBO J.* 2004. V. 23. P. 4061–4071.
121. Shumacher A., Faust C., Magnuson T. // *Nature.* 1996. V. 383. P. 250–253.
122. Voncken J.W., Roelen B.A., Roefs M., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. P. 2468–2473.
123. Boyer L.A., Plath K., Zeitlinger J., et al. // *Nature.* 2006. V. 441. P. 349–353.
124. Lee T.I., Jenner R.G., Boyer L.A., et al. // *Cell.* 2006. V. 125. P. 301–313.
125. Chamberlain S.J., Yee D., Magnuson T. // *Stem Cells.* 2008. V. 26. P. 1496–1505.
126. Woolfe A., Goodson M., Goode D.K., et al. // *PLoS Biol.* 2005. V. 3. P. e7.
127. Ura H., Usuda M., Kinoshita K., et al. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. P. 9713–9723.
128. Addis R.C., Prasad M., Yochem R.L., et al. // *J. Cell. Biochem.* 2010. [Epub ahead of print]
129. Feldman N., Gerson A., Fang J., et al. // *Nat. Cell Biol.* 2006. V. 8. P. 188–194.
130. Gaspar-Maia A., Alajem A., Polesso F., et al. // *Nature.* 2009. V. 460. P. 863–868.
131. Chen X., Xu H., Yuan P., et al. // *Cell.* 2008. V. 133. P. 1106–1117.
132. Huangfu D., Maehr R., Guo W., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2008. V. 26. P. 795–797.
133. Huangfu D., Osafune K., Maehr R., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2008. V. 26. P. 1269–1275.
134. Shi Y., Desponts C., Do J.T., et al. // *Cell Stem Cell.* 2008. V. 3. P. 568–574.
135. Shi Y., Do J.T., Desponts C., et al. // *Cell Stem Cell.* 2008. V. 2. P. 525–528.
136. Mikkelsen T.S., Hanna J., Zhang X., et al. // *Nature.* 2008. V. 454. P. 49–55.
137. Hattori N., Nishino K., Ko Y.G., et al. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 17063–17069.
138. Hattori N., Imao Y., Nishino K., et al. // *Genes Cells.* 2007. V. 12. P. 387–396.
139. Bernstein E., Kim S.Y., Carmell M.A., et al. // *Nat. Genet.* 2003. V. 35. P. 215–217.
140. Kanellopoulou C., Muljo S.A., Kung A.L., et al. // *Genes Dev.* 2005. V. 19. P. 489–501.
141. Murchison E.P., Partridge J.F., Tam O.H., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. P. 12135–12140.
142. Wang Y., Medvid R., Melton C., et al. // *Nat. Genet.* 2007. V. 39. P. 380–385.
143. Marson A., Levine S.S., Cole M.F., et al. // *Cell.* 2008. V. 134. P. 521–533.
144. Tay Y., Zhang J., Thomson A.M., et al. // *Nature.* 2008. V. 455. P. 1124–1128.
145. Tay Y.M., Tam W.L., Ang Y.S., et al. // *Stem Cells.* 2008. V. 26. P. 17–29.
146. Wellner U., Schubert J., Burk U.C., et al. // *Nat. Cell Biol.* 2009. V. 11. P. 1487–1495.
147. Xu N., Papagiannakopoulos T., Pan G., et al. // *Cell.* 2009. V. 137. P. 647–658.
148. Judson R.L., Babiarz J.E., Venere M., Blueloch R. // *Nat. Biotechnol.* 2009. V. 27. P. 459–461.
149. Yu J., Vodyanik M.A., Smuga-Otto K., et al. // *Science.* 2007. V. 318. P. 1917–1920.
150. Chureau C., Prissette M., Bourdet A., et al. // *Genome Res.* 2002. V. 12. P. 894–908.
151. Brockdorff N., Ashworth A., Kay G.F., et al. // *Cell.* 1992. V. 71. P. 515–526.
152. Lee J.T., Davidow L.S., Warshawsky D. // *Nat. Genet.* 1999. V. 21. P. 400–404.
153. Lee J.T., Lu N. // *Cell.* 1999. V. 99. P. 47–57.
154. Wutz A., Jaenisch R. // *Mol. Cell.* 2000. V. 5. P. 695–705.
155. Navarro P., Chambers I., Karwacki-Neisius V., et al. // *Science.* 2008. V. 321. P. 1693–1695.
156. Donohoe M.E., Silva S.S., Pinter S.F., et al. // *Nature.* 2009. V. 460. P. 128–132.
157. Dhara S.K., Benvenisty N. // *Nucleic Acids Res.* 2004. V. 32. P. 3995–4002.
158. Hoffman L.M., Hall L., Batten J.L., et al. // *Stem Cells.* 2005. V. 23. P. 1468–1478.
159. Adewumi O., Aflatoonian B., Ahrlund-Richter L., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2007. V. 25. P. 803–816.
160. Silva S.S., Rowntree R.K., Mekhoubad S., Lee J.T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. P. 4820–4825.

УДК 577.1 577.15

Белковая инженерия пенициллинацилаз

В. И. Тишков^{1,2,3*}, С. С. Савин^{2,3}, А. С. Ясная^{2,4}¹Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3²Учреждение Российской академии наук Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33³ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», 109559, Москва, Цимлянская ул., 16, оф. 96⁴РНЦ «Курчатовский институт», 123182, Москва, пл. Академика Курчатова, 1

*E-mail: vitishkov@gmail.com

Поступила в редакцию 05.09.2010 г.

РЕФЕРАТ Пенициллинацилазы широко используются на практике для получения полусинтетических β -лактамных антибиотиков и хиральных соединений. В данном обзоре рассмотрены последние достижения по получению рекомбинантных ферментов, а также результаты по белковой инженерии пенициллинацилазы G с помощью различных подходов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА пенициллинацилаза, *Escherichia coli*, экспрессия, структура, белковая инженерия.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ПА – пенициллинацилаза, EcПА – пенициллинацилаза из *Escherichia coli*, AfПА – пенициллинацилаза из *Alcaligenes faecalis*, 6-АПК – 6-аминопенициллановая кислота, ФГА – D-фенилглицинамид, ФУК – фенилуксусная кислота, ФГМ – метиловый эфир D-фенилглицина, ЦА – цефалоспориноцилаза из *Penicillium diminuta*.

ВВЕДЕНИЕ

Пенициллинацилаза (ПА, КФ 3.5.1.11) была открыта 60 лет назад как катализатор гидролиза амидной связи в антибиотиках пенициллинового ряда [1]. Этот фермент относится к классу гидролаз, подклассу амидогидролаз и является представителем семейства так называемых N-концевых нуклеофильных гидролаз. ПА была найдена в бактериях, дрожжах и низших грибах. Физиологическая роль фермента до конца не ясна. По-видимому, он служит для утилизации гетероциклических соединений в качестве источника углерода.

ПА изучается уже более 50 лет. На практике этот фермент нашел широкое применение в производстве 6-аминопенициллановой кислоты – основного синтона для получения антибиотиков пенициллинового ряда. Также ПА применяется непосредственно для синтеза различных полусинтетических β -лактамных антибиотиков. Такие свойства этого фермента, как широкая субстратная специфичность, высокие регио-, хемо- и стереоселективность обуславливают его применение для получения оптически чистых соединений (они все больше используются в фармацевтической промышленности), а также для защиты гидроксильных и аминогрупп в пептидном и тонком органическом синтезе.

В настоящее время наиболее широко применяется пенициллинацилаза из *Escherichia coli* (EcПА). Среди

других пенициллинацилаз этот фермент изучен лучше всего, однако эффективность катализируемого EcПА ацильного переноса на β -лактамные ядра недостаточна для того, чтобы полностью вытеснить уже устаревшие методы химического синтеза существующих антибиотиков. В то же время из-за активного распространения патогенов, резистентных к существующим антибиотикам, очень остро стоит проблема поиска новых антибактериальных препаратов с неприродными заместителями, для синтеза которых эффективность ПА дикого типа будет очень низкой. Поэтому задача получения новых мутантных форм фермента с улучшенными синтетическими характеристиками по отношению к неприродным субстратам имеет большое практическое и фундаментальное значение. Другой, не менее важной и актуальной задачей является повышение стереоселективности ПА в реакциях ацилирования аминоспиртов или гидролиза их N-ацильных производных, так как стереоселективность ПА в реакциях получения аминоспиртов на порядок ниже, чем для аминокислот.

Для получения новых форм ферментов с улучшенными свойствами могут быть использованы самые разнообразные подходы, например, различные методы неупорядоченного мутагенеза (направленная эволюция, генная мозаика и т.д.) или направленное введение аминокислотных замен на основе анализа пространственной структуры белковой глобулы (ра-

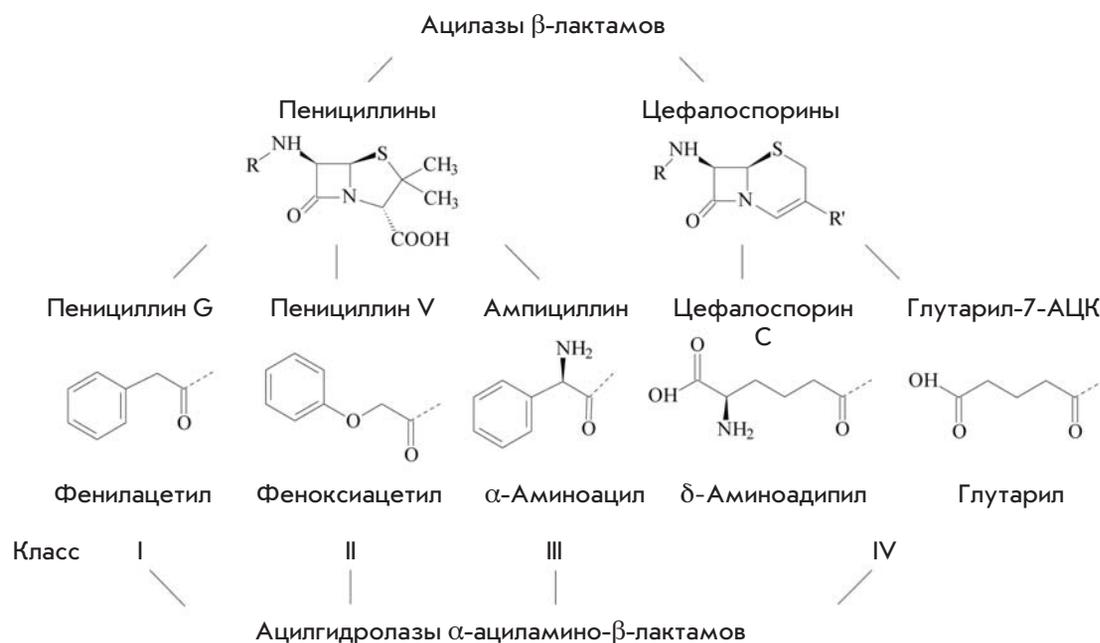


Рис. 1. Современная классификация ацилаз β-лактамов по типу гидролизуемого субстрата [7]. 7-АЦК – 7-аминоцефалоспориновая кислота.

циональный дизайн). В настоящее время все более широко используется последний подход, однако он требует знания трехмерной структуры фермента, которая может быть получена или экспериментально (рентгеноструктурный анализ, ЯМР), или с помощью компьютерного моделирования. В данном обзоре мы рассмотрим последние достижения по получению рекомбинантных пенициллинацилаз с улучшенными свойствами.

КЛАССИФИКАЦИЯ ПЕНИЦИЛЛИНАЦИЛАЗ

Пенициллинацилазы относятся к β-лактамам ацилазам и классифицируются по типу гидролизуемого субстрата: на ферменты, гидролизующие преимущественно пенициллин G, пенициллин V и ампициллин. В 1963 г. была предложена классификация, включающая пенициллинацилазы класса I и класса II [2]. Ферменты, относящиеся к классу I, преимущественно гидролизуют пенициллин V (феноксиметилпенициллин), а ПА класса II – пенициллин G (бензилпенициллин). Позднее к этой классификации был добавлен класс III – ферменты, отвечающие за гидролиз ампициллина (D-α-аминобензилпенициллин) [3–6].

Современная классификация ацилаз β-лактамов по предпочитаемому «ядру» и соответствующим природным боковым радикалам [7] приведена на рис. 1. Согласно этой классификации, ПА класса II дополнительно подразделяются еще на две подгруппы: класс IIa – ферменты, относящиеся к этой группе, осуществляют предпочтительный гидролиз ароматических амидов, и класс IIb – предпочтительный гидролиз алифатических амидов [7, 8].

ИСТОЧНИКИ И ЛОКАЛИЗАЦИЯ ПЕНИЦИЛЛИНАЦИЛАЗ

Впервые пенициллинацилазная активность была описана японскими учеными в 1950 г. [1]. Авторы обнаружили, что мицелий грибов *Penicillium chrysogenum* и *Aspergillus oryzae* способен превращать бензилпенициллин в фенилуксусную кислоту и некое вещество, названное авторами «пеницин», которое позже было идентифицировано, как 6-аминопенициллановая кислота (6-АПК) [1, 9, 10]. Более детальные и тщательные исследования этого фермента относятся уже к 60-м годам XX века. Именно в это время появляется большое число публикаций, посвященных изучению свойств и способов, а также перспектив применения данного фермента, причем число статей, посвященных пенициллинацилазам, с каждым годом только увеличивается.

Пенициллинацилазная активность была обнаружена в бактериях, дрожжах и низших грибах [11–14]. В настоящее время описаны ПА более чем из 40 различных микроорганизмов. Еще большее количество генов пенициллинацилаз было найдено при аннотировании геномов микроорганизмов.

В зависимости от источника фермент может быть локализован как вне, так и внутри клетки. Для пенициллинацилаз G (класс II) характерна локализация активного фермента в периплазматическом пространстве клетки. Внеклеточная экспрессия встречается у штаммов-продуцентов как пенициллинацилаз V (класс I), так и пенициллинацилаз G (класс II). Физиологическая роль ПА до сих пор не ясна, несмотря на то, что этот фермент изучается уже около 60 лет.

Таблица 1. Основные характеристики пенициллинацилаз из различных источников

Класс	Источник	Гидролизуемые субстраты*	Индукцибельность	Локализация в клетке	Ссылка
Класс I ПА-V	<i>Streptomyces lavendulae</i>	Пен-V, Пен-К	нет	вне	[3]
	Dermatophytes	Пен-V	да	внутри	[3]
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Пен-V, Пен-К	да	внутри	[3]
	<i>Bacillus sphaericus</i>	Пен-V	н.д.	вне	[16]
	<i>Fusarium</i> sp.	Пен-V	н.д.	вне	[17]
Класс II ПА-G	<i>E. coli</i>	Пен-G, Пен-X	да	внутри	[18]
	<i>Bacillus megaterium</i>	Пен-G, цефалексин, цефалоглицин, цефалоридин	н.д.	вне	[19]
	<i>Alcaligenes faecalis</i>	Пен-G	н.д.	внутри	[20]
	<i>Providencia rettgeri</i>	Пен-G	н.д.	внутри	[21]
Класс III Амп-ПА	<i>Pseudomonas melanogenum</i>	Амп, цефалоглицин, цефадрин, цефалексин	н.д.	внутри	[22]

* Амп – ампициллин, Пен-G – пенициллин G, Пен-V – пенициллин V, Пен-К – пенициллин K, Пен-X – пенициллин X.

Вероятнее всего, ПА служит для утилизации амидов ароматических соединений в качестве источника углерода [15]. В табл. 1 приведены основные характеристики для некоторых наиболее хорошо изученных пенициллинацилаз.

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ПЕНИЦИЛЛИНАЦИЛАЗЫ G

Ген ПА-G кодирует фермент в виде неактивного предшественника. Он состоит из 4 структурных элементов: сигнального пептида, α- и β-субъединицы и межсубъединичного спейсера. Зрелый фермент в случае ПА-G представляет собой гетеродимер общей массой 86 кДа. Он состоит из двух субъединиц, α- и β-, массой 23 и 63 кДа соответственно [23, 24]. Также в состав молекулы ПА входит связанный атом кальция, который, согласно некоторым данным, способствует процессингу фермента [18].

Посттрансляционная модификация ПА-G является многостадийным процессом и была довольно хорошо изучена на примере фермента из *E. coli*. На первом этапе с помощью сигнального пептида происходит транспорт неактивного белка-предшественника из цитоплазмы в периплазматическое пространство клетки, затем сигнальный пептид отщепляется. Далее происходит выщепление спейсера с образованием активного гетеродимера [23, 25, 26].

В клетках *E. coli* большинство ферментов переносится через мембрану с помощью Sec-транслоказы.

Sec-система распознает сигнальные пептиды, не имеющие совпадений в аминокислотной последовательности, но обладающие похожими физико-химическими свойствами. SecB-шаперон распознает короткую последовательность, включающую ароматический и положительно заряженный аминокислотные остатки, которая затем обрабатывается Sec-транслоказой [27]. SecB – основной компонент, участвующий в транслокации многих секреторных и периплазматических белков. В работе [28] было показано, что белок SecB необходим для образования EcПА-G в активной форме.

Другой путь секреции белков – Tat-система (twin arginin translocation). Считают, что она позволяет транспортировать через мембрану свернувшиеся белки, содержащие кофакторы. Tat-система, по-видимому, является полностью независимой от Sec-системы. Для транспорта с помощью Tat-системы необходимо наличие в последовательности сигнального пептида мотива SRRXFLK, содержащего два остатка аргинина [29]. Последовательность сигнального пептида в белке-предшественнике EcПА содержит два остатка аргинина, разделенных остатком аспарагина (рис. 2). В литературе есть данные, что такой сигнальный пептид также может обеспечивать процессинг фермента с помощью Tat-системы. Более поздние по сравнению с работой [28] исследования показывают, что сигнальный пептид фермента из *E. coli* обеспечивает транслокацию белка-предшественника

Таблица 2. Влияние условий культивирования на выходы рекомбинантных ПА

Источник фермента	Штамм-продуцент		Промотор	Антибиотик-устойчивость	Индуктор	Т, °С	Среда	Добавки	Выход фермента	Ссылка
	организм	штамм								
<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	JM109	trc		ИПТГ/арабиноза	30	LB		112 Ед/л/А ₆₀₀ , 193 Ед/л/А ₆₀₀	[66]
	<i>E. coli</i>	JM109, BL21, HB101	T7	Kn	арабиноза	30	LB	глицерин	330 Ед/л/А ₆₀₀ , 820 Ед/л, 440 Ед/л/А ₆₀₀ , 690 Ед/л	[63]
	<i>E. coli</i>	GM48 HB101	T7 Trc	Kn	ИПТГ	30	LB		84 Ед/л/А ₆₀₀	[32]
	<i>E. coli</i>	MC1000	lacZ	Kn	ИПТГ	28	M9	ФУК	14–650 Ед/г	[67]
	<i>E. coli</i>	DH5α	tac lacI	CmR	ИПТГ					[68]
	<i>E. coli</i>	x6212	trc		ИПТГ				1000 Ед/л, 700 Ед/г	[69]
	<i>E. coli</i>	JM101, JM103, JM105	lac	Kn	ИПТГ, галактоза		M9	глюкоза, галактоза, глюкоза+ галактоза	20–800 Ед/л	[70]
	<i>E. coli</i>							SecB-шаперон	40–126 Ед/л/А ₆₀₀	[28]
	<i>E. coli</i>			Cm	ИПТГ	28	M9	Ca ²⁺	1 г/л 1700 Ед/г	[31]
	<i>E. coli</i>		trc T7 araB	Kn Cm	ИПТГ, арабиноза			degP-шаперон	ПА: 20-800 Ед/л, ПА: 10450 Ед/л	[65]
	<i>E. coli</i>	BL21 (DE3)	T7							[60, 71]
	<i>E. coli</i>	HB101, JM109, MC4100	araB	Cm Kn Amp				degP-шаперон	14–470 Ед/л, 570 Ед/л/А ₆₀₀	[60]
<i>A. faecalis</i>	<i>E. coli</i>			Cm	ИПТГ		M9	Ca ²⁺	2.3 г/л, 14000 Ед/г(АfПА)	[31]
	<i>E. coli</i>	HB101							1000 Ед, 23 мг/л	[20]
	<i>E. coli</i>	JM109	rhaBAD	Amp	рамноза		M9 LB	глюкоза, пролин	4500 Ед/л, 0.96 Ед/мг	[72]
	<i>E. coli</i>	JM109 (DE3)	T7	Kn	ИПТГ		LB		(200–270)×10 ³ Ед/л	[21]
<i>K. citrophila</i>	<i>E. coli</i>	BL21 (DE3)	T7	Kn	ИПТГ		YE TH M9 MR	13460 Ед/л 1190 Ед/л/А ₆₀₀ 28056 Ед/л 1576 Ед/л/А ₆₀₀	[60]	

именно за счет Tat-системы [30]. В случае ПА из *Alcaligenes faecalis* для транспорта используется Sec-система [31].

Эксперименты с белком-предшественником, не содержащим сигнальный пептид, свидетельствуют, что межсубъединичный спейсер сначала отщепляется от N-конца β-субъединицы. В резуль-

тате образуется свободная β-субъединица и полипептид, состоящий из α-субъединицы и спейсера [23]. В процессе созревания белка-предшественника ПА непосредственно в клетке отщепление спейсера также происходит в две стадии [23]. Этими же авторами было показано, что отщепление спейсера от N-конца β-субъединицы возможно только

в периплазме, в то время как отщепление спейсера от С-конца α -субъединицы также возможно и в цитоплазме клетки. В то же время результаты работы [26] свидетельствуют, что первой сворачивается α -субъединица, которая затем выступает в качестве «матрицы» для правильного сворачивания β -субъединицы. Позже было показано, что отщепление межсубъединичного спейсера является автокаталитическим процессом [25]. Критическую роль в правильном сворачивании фермента играют остатки Lys299 и Thr263 (нумерация аминокислотных остатков неактивного предшественника). Аминокислотные замены в этих положениях приводят к существенному снижению выхода активного фермента и преимущественному образованию неактивного предшественника [25, 32].

Суммируя литературные данные, следует отметить, что все стадии процессинга ПА-G играют важную роль в экспрессии фермента в активной и растворимой форме. Введение аминокислотных замен может повлиять на любую из стадий созревания белка-предшественника, поэтому получение новых мутантных ферментов в активной форме потребует тщательного индивидуального подбора условий культивирования.

ЭКСПРЕССИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ПА В *E. coli*

Для клонирования и экспрессии рекомбинантных ферментов в зависимости от задач можно использовать множество различных систем: бактерии [33–36], дрожжи [37–40], растения [41–43], клетки насекомых [44–47] или искусственные бесклеточные системы [48–51]. Поскольку ПА-G встречается только в бактериях, то для ее экспрессии, как правило, выбирают бактериальные системы на основе клеток *E. coli*. Ниже мы рассмотрим различные варианты экспрессии ПА-G в клетках *E. coli*.

Выбор промотора и вектора для экспрессии

В литературе содержится большое количество информации по гетерологической и гомологической экспрессии ПА в *E. coli*. В качестве вектора использовали как низкокопийные, так и высококопийные плазмиды, а для контролируемой экспрессии использовали самые разные типы промоторов: *lac*, *tac*, *trc*, T7 и *araB*. Гены ПА-G были клонированы из *E. coli* [52, 53], *Actinomyces viscosus* [54], *Providencia rettgeri* [55], *Kluyvera citrophila* [56], *Bacillus megaterium* [35, 57] и *A. faecalis* [20]. Влияние типа промотора на выход ПА из различных источников суммировано в табл. 2. Строгой зависимости между типом промотора и выходом активного фермента нет. Как правило, более сильные промоторы (например, промотор РНК-полимеразы фага T7) приводят к высокому уровню экспрессии, однако за-

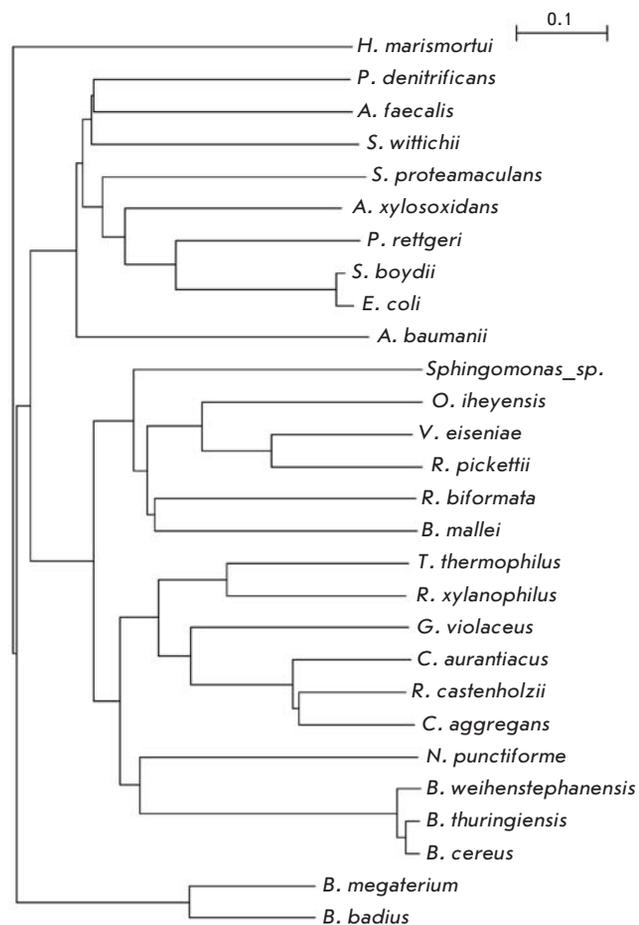


Рис. 3. Филогенетическое дерево пенициллинацилаз G.

частую именно это препятствует правильному сворачиванию фермента и приводит к образованию целевого белка преимущественно в нерастворимой форме в виде так называемых телец включения. Использование менее сильных промоторов часто позволяет увеличить долю растворимого фермента. В каждом случае для конкретного фермента отдельно подбирался оптимальный вариант экспрессирующего вектора.

Фактором, определяющим уровень экспрессии фермента, может быть как транскрипция, так и трансляция [53]. Лимитирующая стадия определяется выбранным вектором и зависит от природы штамма-хозяина. В любом случае большинство исследователей выбирают сильные промоторы – *tac* и T7, а в качестве индуктора используют изопропил- β -D-тиогалактозид (ИПТГ). Проблему увеличения доли растворимого белка в клетке решают за счет оптимизации параметров культивирования.

Влияние температуры

В работе [58] было показано определяющее влияние температуры культивирования на выход ак-

тивной ПА. Эксперименты по экспрессии проводили при трех температурах: 22, 28 и 37°C. Для всех комбинаций плазмиды/штамм-хозяин наибольшие выходы активного фермента наблюдались при 22°C. Такой эффект, вероятнее всего, связан с тем, что при пониженной температуре фермент успевает пройти все стадии посттрансляционной модификации и свернуться в правильную конформацию, за счет этого увеличивается доля растворимого и активного фермента в клетке. При повышении температуры культивирования происходит ускорение синтеза белка, и фермент накапливается в цитоплазме в нерастворимой форме.

Влияние состава среды и различных добавок

Многочисленные исследования показали, что среда для культивирования оказывает большое влияние на уровень экспрессии фермента и на его выход в активной форме. В работе [59] было показано, что наибольшие выходы активной ПА-G достигались при использовании минимальной среды M9 и глюкозы в качестве источника углерода. По сравнению с другими использованными средами доля периплазматического фермента в противовес внутриклеточному возрастала на 2 порядка. В другом случае [60] максимальный выход фермента наоборот был получен при использовании самой богатой среды YE из всех рассмотренных (YE, TH, MR, M9).

Одним из важнейших параметров при культивировании ПА является наличие ионов кальция в среде для культивирования. Ca^{2+} необходим как для роста клеток [61], так и для формирования ПА в активной и растворимой форме, поскольку он входит в структуру молекулы активной ПА [24, 60]. По мнению исследователей, Ca^{2+} необходим для транспорта белка-предшественника через мембрану, а также для корректного сворачивания фермента и созревания белка-предшественника в периплазме [31].

Еще один подход, позволяющий повысить долю растворимой ПА в клетке, – это добавление в богатые среды низкомолекулярных источников углерода. Дополнительный источник углерода позволяет не только увеличить выход биомассы, но и приводит к снижению доли нерастворимого фермента в клетке [62]. В качестве таких источников углерода используют лактозу, глюкозу, арабинозу и глицерин. В работах [62, 63] показано, что добавление глицерина приводит к снижению нерастворимой фракции фермента в периплазматическом пространстве клетки. Как считают некоторые авторы, глицерин может выступать не только в качестве источника углерода, но и как «химический шаперон», облегчая сворачивание и созревание фермента.

Регулирование посттрансляционной модификации

В работе [59] в дополнение к подбору оптимального штамма для экспрессии с одновременной оптимизацией состава среды была модифицирована система транслокации ПА за счет замены сигнального пептида. Как отмечалось выше, сигнальный пептид *EsPA* обеспечивает транспорт белка-предшественника с помощью *Tat*-системы [31], в то же время, согласно литературным данным [64], *Sec*-зависимый экспорт белков происходит быстрее. Замена системы транслокации позволила существенно увеличить долю растворимого фермента в периплазматической фракции.

Использование шаперонов для правильного фолдинга ПА

Еще один активно развивающийся в последние десятилетия подход – это использование шаперонов при оптимизации экспрессии ферментов. В случае ПА большинство исследователей используют *degP*-шапероны, или же шапероны *Sec*-системы, если фермент транспортируется внутри клетки с ее помощью [65]. Использование этого метода позволяет увеличить выходы активного фермента в несколько раз.

Суммируя все вышесказанное, следует отметить, что экспрессия ПА-G зависит от множества факторов. Для создания штамма-суперпродуцента рекомбинантной ПА необходимо иметь детальное представление о лимитирующих стадиях экспрессии

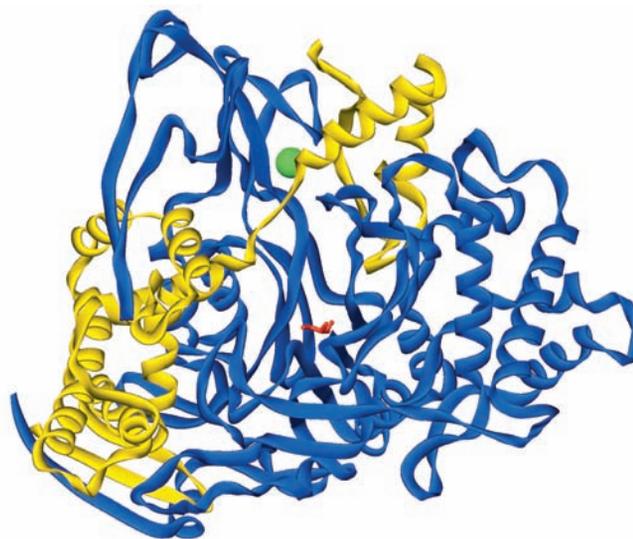


Рис. 4. Структура активного гетеродимера ПА-G из *E. coli* (PDB 1PNK) [24]. Желтым и темно-синим цветом изображены α - и β -субъединицы соответственно. Красным цветом указан каталитический остаток β Ser1, зеленым цветом – ион Ca^{2+} .

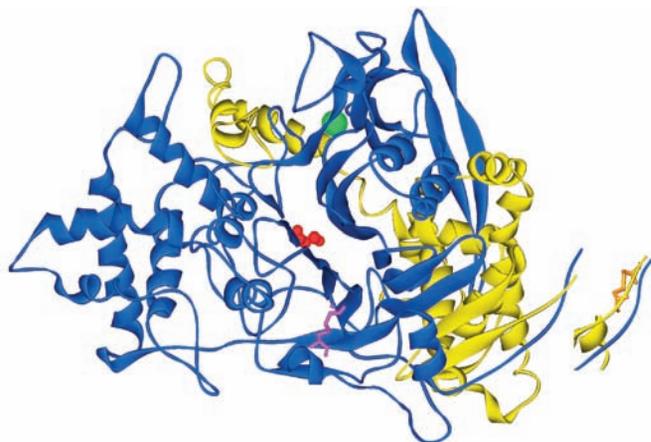


Рис. 5. Структура активного гетеродимера ПА-G из *A. faecalis* (PDB 3K3W). Желтым и темно-синим цветом изображены α - и β -субъединицы соответственно. Красным цветом указан каталитический остаток β Ser1, зеленым цветом – ион Ca^{2+} . Малиновым цветом указана дисульфидная связь в β -субъединице между остатками Cys492 и Cys525 в ферменте дикого типа. Вставка справа показывает фиксацию N-конца α -субъединицы и C-конца β -субъединицы за счет дисульфидной связи (выделена оранжевым цветом), полученной в результате парной аминокислотной замены α Q3C/ β P751C.

для каждого конкретного организма и экспрессионной системы. Выходы активного фермента также могут быть увеличены за счет использования штаммов, дефектных по протеиназам, и изменения системы транслокации фермента.

СТРУКТУРА ПЕНИЦИЛЛИНАЦИЛАЗ G

Первичная структура ПА-G

В настоящее время в базах данных (GeneBank) имеются полные нуклеотидные и аминокислотные последовательности ПА-G из 40 различных источников. На рис. 2 представлено выравнивание аминокислотных последовательностей ПА-G из некоторых источников. Для сравнения были отобраны ферменты, наиболее отличающиеся друг от друга. Полностью на рисунке приведена последовательность ПА из *E. coli*, для остальных ферментов для наглядности указаны только отличающиеся остатки. Темно-серым цветом выделены строго консервативные остатки, а светло-серым – подобные.

Как видно из рисунка, в области сигнальных пептидов не наблюдается никаких консервативных остатков или консенсусных последовательностей. Все они отличаются не только по последовательности аминокислотных остатков, но и по их количеству. Межсубъединичные спейсеры также существенно

отличаются и не имеют консервативных аминокислотных остатков в своей последовательности.

В приведенных последовательностях ПА-G можно выделить два основных консервативных мотива: AQ(D/E)RXXQ(M/L)(E/D) в α -субъединице и NXXYADXXGNI(G/A)Y в β -субъединице. Кроме этих двух участков встречаются еще несколько высококонсервативных остатков, в частности первый и второй аминокислотные остатки в β -субъединице – каталитически важный остаток серина и следующий за ним остаток аспарагина. Общее число высококонсервативных аминокислотных остатков в последовательностях ПА-G не превышает 7%.

На рис. 3 представлено филогенетическое дерево пенициллинацилаз G. Как видно из рисунка, наибольшее число этих ферментов встречается в протеобактериях.

Четвертичная структура ПА-G

Первая трехмерная структура пенициллинацилазы-G была определена в 1995 г. для ПА из *E. coli* с разрешением в 1.9 Å (PDB 1PNK) [24]. Она представлена на рис. 4. Активный фермент – это гетеродимер массой 86 кДа, состоящий из двух субъединиц: α – меньшего размера (24 кДа) и β – большего размера (62 кДа). На N-конце β -субъединицы расположен каталитический остаток серина (на рис. 4 выделен красным цветом). Гетеродимер имеет усредненные размеры 70 x 50 x 55 Å. Полипептидные цепи двух субъединиц формируют пирамидальную структуру с глубокой чашеобразной выемкой в центре, на дне которой находится активный центр.

Как и все Ntn-гидролазы, ПА-G содержит типичный мотив укладки $\alpha\beta\beta\alpha$ [73]. ПА содержит один $\alpha\beta\beta\alpha$ -домен, состоящий из α - и β -субъединиц [24], который является одним из самых больших $\alpha\beta\beta\alpha$ -доменов среди всех известных Ntn-гидролаз [73].

Со структурной точки зрения, вся белковая глобула разделяется на три региона – А, В и С. Регион С включает 8 высококонсервативных для всего семейства Ntn-гидролаз элементов вторичной структуры. Эти 8 элементов образуют три слоя из 4-слойных $\alpha\beta\beta\alpha$ -мотивов, и все они антипараллельны. Регионы А и В объединяют похожие элементы вторичной структуры, пространственное расположение которых совпадает для всех Ntn-гидролаз, а положение этих элементов в полипептидной цепи различно для разных представителей семейства. Для ПА-G регионы А, В и С в полипептидной цепи чередуются в порядке С-В-А.

В конце 2009 г. в базе трехмерных структур белков PDB была выложена структура ПА рекомбинантной пенициллинацилазы из *A. faecalis* (AfПА), экспрессированной в клетках *E. coli* (PDB 3K3W) (рис. 5),

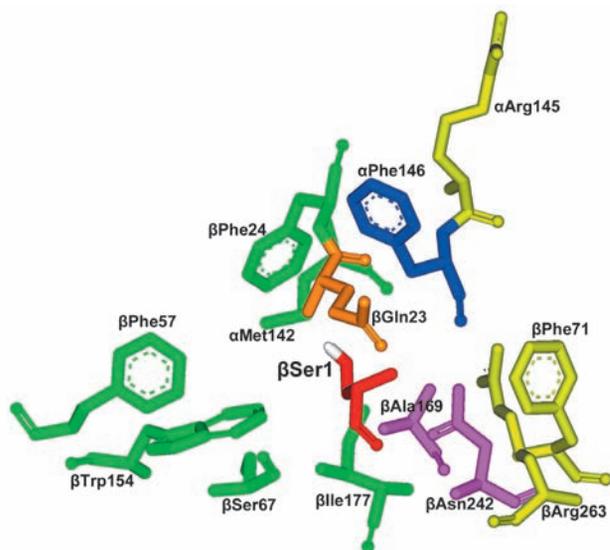


Рис. 6. Ключевые остатки активного центра ПА из *E. coli* (структура PDB 1A14). Красным и оранжевым соответственно указаны каталитический остаток β Ser1 и остаток β Gln23, регулирующий нуклеофильность каталитического остатка. Остатки оксианионного центра выделены малиновым. Зеленым выделены остатки субдомена S1 (связывание ацильной части субстрата), желтым – остатки субдомена S2 (связывание нуклеофильной части субстрата), синим цветом указан остаток α Phe146, который входит в оба субдомена.

хотя впервые этот фермент был выделен и охарактеризован еще в начале 90-х годов прошлого века. В мае 2010 г. в PDB была депонирована вторая структура AfПА, полученная из орторомбического кристалла (PDB 3ML0). Особый интерес к AfПА связан с тем, что ее термостабильность одна из самых высоких среди известных пенициллинацилаз G. Анализ структуры этого фермента свидетельствует, что повышенная температурная стабильность связана с наличием в β -субъединице дисульфидной связи между остатками Cys492 и Cys525 (на рис. 5 выделены малиновым цветом), которой нет в EcПА. Структура AfПА демонстрирует высокую пространственную гомологию с таковой для EcПА. Компьютерное наложение структур этих ферментов показывает, что молекула AfПА обладает такой же пространственной организацией полипептидной цепи, особенно в области активного центра. Небольшие отклонения в укладке полипептидной цепи обнаруживаются только на «периферии» во внешней оболочке фермента. Следует отметить, что обе структуры AfПА имеют низкое по современным меркам разрешение – 3.3 и 3.5 Å для PDB3K3W.ENT и PDB3ML0.ENT соответственно. Такое разрешение не позволяет судить о положении и взаимодействии отдельных остатков в области ак-

тивного центра, что особенно важно при обсуждении их роли в катализе.

СТРУКТУРА АКТИВНОГО ЦЕНТРА EcПА

Строение каталитического домена

В ранних работах по изучению ПА было показано, что ключевую роль в катализе играет остаток серина. Ковалентная модификация этого остатка при помощи фенолметилсульфонилфторида (ФМСФ) приводит к полной потере ферментом каталитической активности [74]. Данные рентгеноструктурного анализа ковалентного комплекса ПА с ФМСФ (PDB 1PNM) [18] уточнили, что этим ключевым остатком является N-концевой остаток серина β -цепи. Вблизи остатка β Ser1 нет имидазольных и карбоксильных групп, которые обычно присутствуют в активном центре сериновых протеиназ и принимают участие в каталитических актах ацилирования и деацилирования посредством переноса протона. Поэтому ПА отнесли к классу так называемых гидролаз с N-концевым нуклеофилом или Ntn-классу (N-terminal nucleophile) [75].

На основании данных по структуре EcПА в 1995 г. была предложена модель каталитического механизма Ntn-гидролаз [24]. N-Концевой остаток серина β Ser1 выступает в роли нуклеофила (на рис. 6 показан красным). В ходе реакции ковалентный интермедиат формируется через образование переходного состояния, которое стабилизируется так называемым оксианионным центром. Рядом с нуклеофилом β Ser1 расположен остаток β Gln23 (рис. 6, показан оранжевым). Этот остаток повышает нуклеофильность каталитического серина. Оксианионный центр образуют остатки β Asn242 и β Ala69 (на рис. 6 выделены малиновым).

Сравнение аминокислотных последовательностей ПА-G из различных источников (рис. 3) свидетельствует, что остаток β Asn242 строго консервативен для всех представленных ферментов, в то время как остаток β Ala69 встречается только в половине последовательностей, а в остальных четырех случаях на этом месте располагается остаток аспарагина.

Строение субстратсвязывающего домена

Субстратсвязывающий домен активного центра состоит из двух поддоменов – S1 и S2. Наиболее высокую специфичность проявляет субдомен S1, он отвечает за связывание ацильной части субстрата и состоит в основном из гидрофобных остатков. Закрытая структура этого домена и его гидрофобность делают фермент очень селективным по отношению к бензольному кольцу с небольшими заместителями у C_{α} -атома или ароматического кольца. Основными

остатками, которые формируют закрытую структуру домена S1, являются следующие: α Met142, α Phe146, β Phe24, β Phe57, β Trp154, β Ile177 и β Ser67 (на *рис. 6* выделены зеленым). Их дополняют остатки β Pro22, β Gln23, β Val56, β Thr68, β Phe71, β Leu253 и β Phe256 [24, 73] (на *рис. 6* не показаны). Как видно из перечисленного списка, только два остатка принадлежат α -субъединице, а большинство гидрофобных остатков, играющих основную роль в связывании ацильной части субстрата, находятся в β -цепи. Стерически ограниченная гидрофобная полость в свободном состоянии имеет термодинамически невыгодный контакт с окружающей средой. В результате гидрофобного взаимодействия субстрата с ферментом имеет место двойной выигрыш в энергии. Во-первых, за счет энергии переноса гидрофобного субстрата из воды в гидрофобную полость фермента и, во-вторых, за счет вытеснения воды из активного центра.

Предполагаемые π - π -взаимодействия существуют между бензольными кольцами фенилуксусной кислоты (ФУК) и β Phe24, которые располагаются параллельно друг другу. Остаток α Phe146 находится на противоположной стороне гидрофобного кармана. Он также взаимодействует с ФУК и при этом экранирует активный центр от растворителя. Еще один остаток фенилаланина, β Phe57, локализован на дне полости. Наименьшее расстояние между ним и ингибитором составляет 4.7 Å, что слишком много для прямого взаимодействия. Однако этот остаток может быть важен для поддержания структуры сайта связывания, поскольку находится на расстоянии 3.5 и 3.9 Å от остатков β Pro22 и β Phe24 соответственно, которые непосредственно участвуют в связывании субстрата.

Второй важный субдомен субстратсвязывающего участка активного центра – поддомен S2, отвечающий за связывание нуклеофильной части. Он представляет собой дно чашеобразной выемки в центре структуры и обеспечивает довольно широкую специфичность фермента к нуклеофильной части. Кроме того, этот субдомен энантиоселективен и дает возможность использовать фермент для разделения оптических изомеров аминов. Домен S2 составляют остатки α Arg145, α Phe146, β Phe71 и β Arg263 (*рис. 6*, выделены желтым) [76–80].

Как показывает анализ структуры комплекса неактивного мутанта *Ec*ПА β Asn241Ala с пенициллином [79], антибиотик на первом этапе связывается в открытой конформации, что позволяет объемной амидной части субстрата войти в активный центр фермента. В открытой конформации фенильное кольцо остатка β Phe71 оказывается в плоскости, параллельной β -лактамному кольцу субстрата. Более того, в результате сорбции субстрата возникают ван-дер-ваальсовы взаимодействия между метильной груп-

пой пенициллина и $C^{\delta 1}$ -атомом α Phe146, что также усиливает связывание.

Комплекс нативного фермента с «медленным» субстратом сульфоксидом пенициллина G (PDB 1PNM) дает представление о структуре фермента перед актом катализа [78]. Позиции остатков α Arg145 и α Phe146 в данном случае соответствуют закрытой конформации, а амидная группа β Asn241 образует водородную связь с карбонильным кислородом субстрата.

Мутационный анализ остатков α Arg145 и β Arg263 показывает, что оба остатка существенны для катализа, а β Arg263 необходим также для автокаталитического созревания [77]. Полученные структурные и кинетические данные также указывают на то, что остаток β Arg263 принимает участие в стабилизации переходного состояния, положительный заряд которого увеличивает полярность оксианионного центра. Следует отметить, что остатки как β Arg263, так и α Arg145 консервативны и присутствуют в пенициллинацилазах G почти из всех известных источников (см. *рис. 2*).

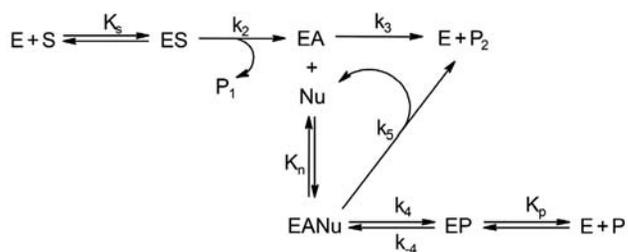
Еще одной особенностью каталитического механизма ПА является существование активного центра в открытой и закрытой конформации, что было показано в работе [80], в которой были определены структуры *Ec*ПА в комплексе с различными лигандами. Открытая конформация необходима для связывания субстрата, а для катализа необходимо экранирование активного центра от растворителя, что достигается в закрытой конформации.

БЕЛКОВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ ПА-G

Раньше основным подходом для увеличения эффективности промышленно значимых процессов была оптимизация условий биокаталитического процесса. Такая оптимизация проводилась на основании кинетических параметров ферментативной реакции и физико-химических свойств компонентов реакционной среды. Такой подход вполне оправдывает себя и дает возможность получить очень хорошие результаты. Однако в настоящее время этот подход практически полностью реализовал свой потенциал и уходит на второй план, уступая место дизайну самих ферментов.

Рентгеноструктурный анализ ПА, ее мутантов и комплексов с различными субстратами открыл совершенно новые возможности как для понимания структурно-функциональных взаимосвязей, так и для рационального дизайна активного центра фермента. Цель такого дизайна – улучшение свойств фермента, в первую очередь тех, которые могли бы увеличить эффективность ПА в реакциях синтеза антибиотиков и разделения энантиомеров.

В силу термодинамических причин для синтеза антибиотиков используется не прямая конденсация, а реакция нуклеофильного замещения. Минимальная схема приведена ниже:



Минимальная схема получения полусинтетических β-лактамных антибиотиков с помощью реакции нуклеофильного замещения. E, S и ES – фермент, субстрат (донор ацильной части) и фермент-субстратный комплекс соответственно, EA, Nu и EANu – ацилфермент, нуклеофил и двойной комплекс ацилфермент-нуклеофил соответственно. K_s , K_n и K_p – константы связывания субстрата, нуклеофила и продукта синтеза со свободным ферментом E, ацилферментом EA и свободным ферментом E соответственно.

В работах [81, 82] приведен подробный анализ этой схемы, а также различных ее модификаций. Основным результатом проведенного анализа является вывод о том, что для описания эффективности процесса нельзя использовать «привычные» энзимологам параметры, такие, как величины каталитической константы, константы Михаэлиса и констант ингибирования продуктами реакции. Вместо них используют параметры α , β и γ . Параметр $\alpha = (k_{-4}/K_p)/(k_2/K_s)$ характеризует специфичность фермента по отношению к продукту и исходному ацильному донору, параметр $\beta = k_4/(k_3 \cdot K_n)$ – максимальную нуклеофильную активность акцептора, а $\gamma = k_5/k_4$ – способность тройного комплекса EANu превращаться по гидролитическому или синтетическому пути (соотношение скоростей синтеза и гидролиза S/H при превращении комплекса EANu). В связи с вышесказанным, именно эти параметры и будут нами использованы для оценки эффективности экспериментов по белковой инженерии ПА при исследовании мутантных ферментов в синтезе антибиотиков.

Получение химерных ПА с помощью генной мозаики

В настоящее время для получения мутантных ферментов с улучшенными свойствами широко используются самые различные подходы, основанные как на упорядоченном, так и на неупорядоченном введении аминокислотных замен и даже целых фрагментов полипептидной цепи. Одним из таких методов, который стал популярен в последние годы и который успешно ис-

Таблица 3. Синтетические свойства родительских и гибридных ПА (15 мМ D-ФГА, 25 мМ 6-АПК, pH 7.0)

Фермент	α	β , мм ⁻¹	γ	P_{max} , мМ	v_{ps} , %
ПА <i>E. coli</i>	7.8	78	0.14	2.2	100
ПА <i>K. cryocrescens</i>	12.7	98	0.19	2.1	110
ПА <i>P. rettgeri</i>	5.8	32	0.30	1.9	59
ПА 6G8	11.1	130	0.12	2.6	149
ПА 73C4	11.6	120	0.12	2.4	95
ПА 6B11	6.4	115	0.13	2.5	115

пользуется для улучшения свойств ферментов, вовлеченных в технологические процессы, является генная мозаика (DNA shuffling). Этот метод основан на рекомбинации генов гомологичных ферментов из различных организмов, в результате чего получаются химерные белки с самым разнообразным набором отдельных фрагментов из исходных ферментов.

Методика генной мозаики была применена для пенициллинацилаз из *E. coli*, *K. cryocrescens* и *P. rettgeri* [83]. Степень идентичности между генами этих ферментов составляет 77% (*E. coli* – *K. cryocrescens*), 61% (*E. coli* – *P. rettgeri*) и 61% (*K. cryocrescens* – *P. rettgeri*). Анализ 81 трансформанта выявил 3 гибридных фермента как с более высокой каталитической активностью (v_{ps}), так и с улучшенными синтетическими свойствами (табл. 3).

Интересно отметить, что для гибрида 6B11 избирательно улучшаются все параметры, при этом уменьшение α , что было показано в независимом эксперименте, вызвано двукратным увеличением K_p для продукта синтеза – ампициллина, а для гибрида 73C4 увеличение α вызвано двукратным увеличением K_s для D-ФГА.

Секвенирование показало, что гибридные мутанты 6B11 и 73C4 получены за счет включения в ген ПА из *E. coli* участков гена ПА из *K. cryocrescens*. Также были найдены случайные мутации, не относящиеся ни к одному из родительских генов, большинство из которых находилось далеко от активного центра. Однако даже такие мутации могут быть достаточно эффективны. Так, мутация остатка β Gly385Ser, находящегося на расстоянии 13.5 Å от активного центра и найденная в гибриде 6G8, может влиять на доступность активного центра в целом. Для изучения вклада этой мутации в синтетические свойства гибрида 6G8

Таблица 4. Каталитическая эффективность мутантных ЕсПА в реакциях синтеза антибиотиков [84]

Фермент	Донор ацильной части	Ампициллин			Цефалексин		
		α	β , мМ ⁻¹	1/ γ	α	β , мМ ⁻¹	1/ γ
PAS2	ФГА	13.2	0.5	6	7.3	0.5	59
	ФГМ	16.4	0.5	6	9.1	0.5	59
α R160K α F161L β F24M	ФГА	218	6.3	364	58.8	18.4	69
	ФГМ	8.8	6.3	364	2.4	18.4	69
β F24A	ФГА	209	10.2	286	88.8	21.5	154
	ФГМ	11.6	10.2	286	4.9	21.5	154
α R160P α F161A β F24A	ФГА	200	4.9	167	57.2	21.1	58
	ФГМ	7.6	4.9	167	2.2	21.1	58

авторы сделали соответствующую одиночную замену в ПА *E. coli*. Полученные результаты впечатляют своей непредсказуемостью: максимальный выход продукта увеличился на 22%, а соотношение S/N на 80% по сравнению с ферментом дикого типа в идентичных условиях, при этом также не наблюдалось увеличения параметра α . Аналогично была обнаружена случайная мутация α Asp148Gly, которая для вновь созданного одиночного мутанта дает увеличение выхода в синтезе ампициллина на 20% при увеличении S/N на 80%. В отличие от предыдущего случая, этот эффект можно объяснить тем, что остаток α Asp148 расположен в основании каталитической α -петли, ответственной за конформационные переходы в активном центре, и, как было показано на примере мутагенеза остатков α Arg145 и α Phe146, любые изменения в этой петле могут привести к изменению как субстратной специфичности, так и каталитической активности.

Таким образом, метод геномной мозаики можно использовать не только как инструмент получения гибридных мутантов ПА с улучшенными свойствами, но и как многообещающий инструмент поиска новых мишеней для сайт-направленного мутагенеза, которые невозможно было бы предсказать на основании изучения трехмерной структуры фермента.

Комбинационный насыщающий мутагенез

В работе [84] для трех аминокислотных остатков, расположенных вблизи от активного центра фермента, α R160, α F161 и β F24, был использован подход, сочетающий насыщающий мутагенез каждого остатка с комбинированием введенных мутаций (т.е. получали как одинарные, так и двойные, и тройные мутанты). С помощью вырожденных праймеров был проведен неупорядоченный мутагенез этих остатков и получена библиотека, содержащая более 700 различных клонов. Скрининг проводился с помощью высокоэффективной

жидкостной хроматографии по способности полученных мутантов к синтезу ампициллина. В результате были отобраны три мутанта с повышенными каталитическими характеристиками в реакции синтеза ампициллина (табл. 4). Причем один из мутантов – β F24A, также проявляет повышенные каталитические характеристики в реакции синтеза цефалексина.

Однако метод неупорядоченного мутагенеза в случае ПА не нашел широкого применения из-за отсутствия простой системы скрининга полученных мутантов. Наиболее широкое распространение получил метод направленного мутагенеза.

РАЦИОНАЛЬНЫЙ ДИЗАЙН

Участок связывания ацильной части

Для эффективного гидролиза природных антибиотиков с целью получения β -лактамных ядер желательна низкая специфичность к побочному продукту гидролиза бензилпенициллина – фенилуксусной кислоте, конкурентному ингибитору ПА. Для эффективного синтеза полусинтетических неприродных антибиотиков важна высокая специфичность к C_α -замещенным производным ФУК (*D*-фенилглицин, миндальная кислота, C_α -метил-ФУК), при этом достигается более полное насыщение по ацильному донору. Для природных ПА значения константы Михаэлиса для C_α -замещенных производных ФУК составляют величину порядка 10–100 мМ, что в 100–1000 раз выше, чем для ФУК [85]. В связи с этим получение мутантов с низкими значениями константы Михаэлиса для C_α -замещенных ФУК и высокими константами ингибирования для ФУК представляет большой практический интерес.

В работе [86] были получены точечные β Phe24Ala и α Phe146Tyr и двойной β Phe24Ala/ α Phe146Tyr мутанты, отвечающие этим требованиям. Напри-

мер, в случае мутанта *Ec*ПА β Phe24Ala ингибирование ФУК по сравнению с ферментом дикого типа было снижено в 18 раз ($K_p = 1.1$ и 0.06 мМ соответственно), а сродство к C_α -замещенным производным ФУК было увеличено в 5 раз. При конструировании мутантов авторы предположили, что замена гидрофобных остатков, составляющих основу центра связывания ацильной части, может существенно изменить специфичность фермента по отношению как к C_α -замещенным ФУК, так и к самому природному субстрату.

Рентгеноструктурные данные, полученные для этих мутантов в комплексе с различными производными ФУК, объясняют наблюдаемые эффекты. Так, удаление ароматического кольца в мутанте β F24A приводит к структурным перестройкам в активном центре, в результате чего в этом мутанте ФУК связывается в открытой конформации в отличие от фермента дикого типа, где ФУК связывается в закрытой конформации. В результате такого связывания исчезают водородные связи между карбонильным кислородом ФУК и остатками β Ala69 и β Asn241, образующими оксианионный центр, что объясняет многократное увеличение константы ингибирования.

В отличие от ФУК C_α -метил-ФУК в мутанте β F24A связывается в закрытой конформации. При этом C_α - CH_3 занимает место удаленной фенильной группы, что приводит к десятикратному улучшению связывания.

Интересно также заметить, что мутация по остатку β Phe24 оказывает сильное влияние на стереоспецифичность фермента по отношению к (*R*)-изомерам C_α -замещенных производных ФУК и может рассматриваться как потенциальная мишень для изменения энантиоизбирательности фермента с целью получения оптически чистых C_α -замещенных производных ФУК.

Замена фенилаланина на тирозин в мутанте α F146Y не приводит к конформационным перестройкам в активном центре, что объясняет связывание ФУК, сравнимое с *Ec*ПА дикого типа. Однако при связывании C_α -замещенных ФУК образующиеся ван-дер-ваальсовы контакты между C_α -заместителем и α Tyr146:ОН делают связывание более продуктивным.

В работе [87] была изменена природная пенициллиновая специфичность ПА *E. coli* на цефалоспориновую, что открыло возможность использования ПА для получения 7-аминоцефалоспориновой кислоты. Для установления соответствия остатков, ответственных за связывание ароматической гидрофобной ацильной части пенициллина в ПА и линейной гидрофильной (глутарильной) ацильной части цефалоспорина в цефалоспоринацилазе из *P. diminuta* (ЦА), было проведено выравнивание аминокислот-

Таблица 5. Кинетические параметры синтеза ампициллина для *Ec*ПА дикого типа и мутантов по α Arg145 (15 мМ D-ФГА, 25 мМ 6-АПК, pH 7.0)

Фермент	α	β , мМ ⁻¹	γ	P_{max} , мМ
<i>Ec</i> ПА дикий тип	7.7	80	0.14	2.2
<i>Ec</i> ПА α Arg145Gly	29	420	0.04	3.6
<i>Ec</i> ПА α Arg145Ser	14	350	0.05	3.3
<i>Ec</i> ПА α Arg145Leu	15	280	0.06	2.8

ных последовательностей *Ec*ПА и ЦА. На основании проведенного сравнения семь остатков гидрофобного кармана *Ec*ПА заменили на соответствующие семь остатков из ЦА. Полученный таким образом многоочечный мутант характеризовался восьмикратным улучшением специфичности по отношению к цефалоспоринону С. К сожалению, эти результаты пока представляют собой не более чем научную ценность, так как величина удельной активности полученного мутанта была намного ниже активности природного цефалоспоринового фермента.

Направленный мутагенез на участке связывания нуклеофила

Одного лишь улучшения связывания ацильной части субстрата недостаточно для повышения синтетических способностей фермента. Как было показано в работе [88] для мутанта β Phe24Ala, улучшение связывания D-фенилглицинамида приводит также к увеличению связывания продукта синтеза – ампициллина и, как следствие, к увеличению параметра α . Однако интересным оказался тот факт, что мутации по остаткам β Phe24 и α Phe146, отвечающим за связывание ацильной части, приводят также к улучшению нуклеофильности 6-АПК более чем в 2 раза.

С одной стороны, это не противоречит базовым принципам структурной организации белковой молекулы в том, что изменение или удаление одного из звеньев белковой цепи может привести к структурным перестройкам в близлежащих областях. Мутации на участке связывания ацильной части могут, в принципе, привести к изменениям на участке связывания нуклеофила, при том что остатки β Phe24 и α Phe146 находятся на пограничной области, образуя горлышко гидрофобного кармана (рис. 6).

С другой стороны, нельзя точно определить какой из факторов – улучшение связывания нуклеофила (K_n) или уменьшение реакционной способности воды (k_3 , k_5), играет решающую роль. Так, замена β Phe24Ala могла спровоцировать изменение поло-

жения соседнего остатка, $\beta\text{Glu}23$, координирующего деацилирующую молекулу воды и, таким образом, уменьшить скорость гидролиза. Однако на основании имеющихся данных совершенно точно установлено, что улучшение специфичности фермента по отношению к нуклеофилу приводит к увеличению β , поэтому эффекты от мутаций на участке связывания нуклеофила являются наиболее предсказуемыми. В работе [89] авторы добились значительного увеличения параметра β за счет мутаций по остатку $\alpha\text{Arg}145$, который по данным рентгеноструктурного анализа взаимодействует с карбоксильной группой пенициллина в закрытой конформации и может также влиять на эффективность связывания 6-АПК. Для изучения всех возможных эффектов от замены $\alpha\text{Arg}145$ был проведен насыщающий мутагенез. Предварительные исследования реакций ферментативного синтеза ампициллина в разбавленных растворах показали, что у всех 19 мутантов возрастает способность к переносу ацильной группы на 6-АПК. Далее были отобраны три наиболее перспективных мутанта *EcPA* – $\alpha\text{Arg}145\text{Leu}$, $\alpha\text{Arg}145\text{Gly}$, $\alpha\text{Arg}145\text{Ser}$, и проведено детальное изучение их кинетических параметров (табл. 5).

Полученные данные свидетельствуют о том, что удаление положительного заряда в позиции $\alpha145$ приводит к значительному увеличению нуклеофильной способности 6-АПК. Почти синхронное увеличение α наводит на мысль о том, что улучшение связывания нуклеофила (K_n , см. схему выше), выраженное в увеличении β , неизбежно ведет к улучшению связывания продукта синтеза (K_p , см. схему выше) и невозможно улучшить оба параметра сразу. Однако негативное влияние α можно в какой-то степени нивелировать, если выводить ампициллин из реакционной среды.

С целью уточнения влияния эффекта от замены остатка $\alpha\text{Phe}146$, который, по данным рентгеноструктурного анализа, взаимодействует с метильной группой пенициллина при его связывании в открытой конформации и, в принципе, может оказывать влияние на связывание β -лактамного кольца 6-АПК, был произведен аналогичный мутационный анализ. Предварительные исследования реакций синтеза ампициллина показали, что практически у всех 19 мутантов возрастает способность к переносу ацильной группы на 6-АПК, однако каталитическая активность падает по крайней мере на порядок, что не позволяет авторам более детально исследовать их синтетические способности.

Ярким примером эффективности использования рационального дизайна для улучшения каталитических свойств *EcPA* является работа [90]. Авторами были проведены анализ структуры и компьютерное моделирование связывания в активном центре *EcPA*

ряда лигандов. Результаты моделирования показали, что мутация по остатку $\beta\text{Phe}71$ изменяет ориентацию субстрата и усиливает взаимодействие субстратов с оксианионным центром, поэтому следовало ожидать, что мутация по этому остатку может увеличить каталитическую активность пенициллинацилазы и изменить стереоселективность, так же как и специфичность фермента по отношению к уходящей группе. Было получено четыре мутанта – $\beta\text{Phe}71\text{Lys}$, $\beta\text{Phe}71\text{Glu}$, $\beta\text{Phe}71\text{Leu}$ и $\beta\text{Phe}71\text{Arg}$. Три мутанта показали более высокие каталитические характеристики при синтезе антибиотиков, а два мутанта – более высокую стереоселективность при разделении энантиомеров, однако эффект введения определенной аминокислоты для вышеописанных процессов был противоположным. Например, мутант с заменой $\beta\text{Phe}71\text{Leu}$ имел наиболее высокие каталитические характеристики в синтезе антибиотиков, в то время как его энантиоселективность была почти на порядок хуже, чем у фермента дикого типа. Самый большой эффект увеличения энантиоселективности наблюдался для мутанта $\beta\text{Phe}71\text{Lys}$, однако его эффективность в синтезе антибиотиков была намного ниже по сравнению с мутантом $\beta\text{Phe}71\text{Leu}$. На основании полученных данных был сделан вывод, что одновременное улучшение всех основных каталитических свойств фермента для использования в биокатализе вряд ли представляется возможным, и для решения конкретной задачи в зависимости от структуры субстрата необходимо проводить тонкую индивидуальную настройку фермента.

Получение пермутированного фермента

Еще один подход к изменению свойств фермента – это получение так называемых пермутированных ферментов. Как видно из рис. 4 и 5 в ПА из *E. coli* и *A. faecalis* N-конец α -субъединицы сближен с C-концом β -субъединицы, что позволяет получить пермутированный одноцепочечный фермент за счет соединения этих концов гибким спейсером. Создание такого одноцепочечного фермента позволит получать рекомбинантный фермент прямо в цитоплазме, в этом случае будут исключены стадии транспортировки белка-предшественника в периплазму и выщепления межсубъединичного спейсера, которые, как было показано выше, являются основными причинами низкого выхода фермента в существующих системах экспрессии ПА-G. В настоящее время для ПА-G известна всего одна работа по получению пермутированного фермента [91]. В качестве сшивки была выбрана последовательность из четырех случайных аминокислотных остатков. Была создана библиотека мутантных клонов с геном пермутированного фермента. В результате скрининга этой библиотеки было найдено 20 клонов, продуцирующих

активный фермент, однако по величине специфической активности все полученные варианты значительно уступали ферменту дикого типа.

Стабилизация AfPA за счет образования дисульфидных связей

Как уже отмечалось выше, ПА из *A. faecalis* является одной из самых термостабильных среди известных пенициллинацилаз [20], и это свойство обусловлено наличием в структуре AfPA дисульфидной связи внутри β -субъединицы (рис. 5). Для дальнейшей стабилизации фермента было решено ввести дополнительную дисульфидную связь [92]. Поскольку на момент проведения экспериментов (2006 г.) структура фермента еще не была определена, то авторы построили модельную структуру методом гомологичного моделирования на основе известной структуры EcPA. Для поиска возможных положений введения дисульфидной связи авторы использовали программу MODIP. В результате компьютерного анализа модельной структуры программой было предложено 32 варианта введения дисульфидной связи, из которых после дополнительного анализа авторы выбрали только два варианта – парные аминокислотные замены α Q3C/ β P561C и α T52C/ α Y64C. В случае первой пары замен должна была образоваться ковалентная связь между N-концом α -субъединицы и C-концом β -субъединицы (рис. 5, вставка), который практически не структурирован (рис. 5). В случае второй пары замен образующаяся дисульфидная связь должна была стабилизировать петлю, соединяющую две α -спирали. Анализ свойств полученных мутантов показал, что введение точечных замен α Glu3Cys и β Pro561Cys не влияло на скорость термоинактивации, в то время как в случае двойной замены тем-

пература, при которой фермент терял 50% активности, за 20 мин возросла на 3°C – с 50 до 53°C. В случае второй пары замен термостабильность фермента не изменилась. Отсутствие эффекта стабилизации для второй пары замен позволяет предположить, что стабильность двух α -спиралей не является критической для общей стабильности белковой глобулы. Это предположение согласуется с последними данными рентгеноструктурного анализа, согласно которым эти α -спирали имеют дополнительные контакты со структурными элементами β -субъединицы.

Выводы

Несмотря на большое количество работ по белковой инженерии пенициллинацилаз, проблема направленного изменения каталитических свойств и стабильности ПА еще очень далека от решения. Как видно из приведенных данных, на катализ влияют остатки в радиусе 15–20 Å вокруг каталитического центра фермента. Поэтому задача детального изучения роли аминокислотных остатков в области активного центра в катализе и субстратной специфичности и получение информации об их влиянии на конкретные каталитические характеристики с теми или иными субстратами являются очень актуальными как с точки зрения практической биотехнологии, так и с позиций фундаментальной науки. Можно надеяться, что выделение и изучение свойств пенициллинацилаз из других источников также позволит выявить основные закономерности во взаимосвязи структура–функция этого фермента. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке
Российского фонда фундаментальных
исследований (грант № 10-04-01334-а).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Sakaguchi K., Murao S. // J. Agr. Chem. Soc. Japan. 1950. V. 23. P. 1–3.
- Claridge C.A., Luttinger J.R., Lein J. // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1963. V. 113. P. 1008–1012.
- Hamilton-Miller J.M. // Bacteriol. Rev. 1966. V. 30. P. 761–771.
- Valle F., Balbas P., Merino E., et al. // Trends Biochem. Sci. 1991. V. 16. P. 36–40.
- Arroyo M., de la Mata I., Acebal C., et al. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003. V. 60. P. 507–514.
- Rajendhran J., Gunasekaran P. // J. Biosci. Bioeng. 2004. V. 97. P. 1–13.
- Polderman-Tijmes J.J. Biochemical characterization of alpha-amino acid ester hydrolases. Ph.D. Thesis. Groningen: University of Groningen, 2004.
- Deshpande B.S., Ambedkar S.S., Sudhakaran V.K., et al. // World J. Microbiol. Biotechnol. 1994. V. 10. P. 129–138.
- Murao S. // J. Agr. Chem. Soc. Japan. 1955. V. 29. P. 404–407.
- Batchelor F.R., Doyle F.P., Nayler J.H.C., et al. // Nature. 1959. V. 183. P. 257–259.
- Vanderhaeghe H. // Methods Enzymol. 1975. V. 43. P. 721–728.
- Shewale J.G., Deshpande B.S., Sudhakaran V.K., et al. // Process Biochem. Int. 1990. V. 25. P. 97–103.
- Shewale J.G., Sudhakaran V.K. // Enzyme Microb. Technol. 1997. V. 20. P. 402–410.
- Bruggink A., Roos E.C., De Vroom E. // Org. Process. Res. Dev. 1998. V. 2. P. 128–133.
- Швядас В.К., Клесов А.А., Ныс П.С. // Антибиотики. 1976. Т. 21. С. 698–704.
- Pundle A., SivaRaman H. // Curr. Microbiol. 1997. V. 34. P. 144–148.
- Sudhakaran V.K., Shewale J.G. // Hindustan Antibiot. Bull. 1995. V. 37. P. 9–15.
- Hewitt L., Kasche V., Lummer K., et al. // J. Mol. Biol. 2000. V. 302. P. 887–898.
- Savidge T.A., Cole M. // Methods Enzymol. 1975. V. 43. P. 705–721.
- Verhaert R.M., Riemens A.M., van der Laan J.M. // Appl. Environ. Microbiol. 1997. V. 63. P. 3412–3418.
- Cheng T., Chen M., Zheng H. // Protein. Expr. Purif. 2006. V. 46. P. 107–113.
- Kim D.J., Byun S.M. // Biochim. Biophys. Acta. 1990. V. 1040. P. 12–18.

23. Schumacher G., Sizmman D., Haug H., et al. // *Nucleic. Acids Res.* 1986. V. 14. P. 5713–5727.
24. Duggleby H.J., Tolley S.P., Hill C.P., et al. // *Nature.* 1995. V. 373. P. 264–268.
25. Kasche V., Lummer K., Nurk A., et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1999. V. 1433. P. 76–86.
26. Lindsay C.D., Pain R.H. // *Eur. J. Biochem.* 1990. V. 192. № 1. P. 133–141.
27. Economou A. // *FEBS Lett.* 2000. V. 476. P. 18–21.
28. Chou C.P., Tseng J.H., Kuo B.Y., et al. // *Biotechnol. Prog.* 1999. V. 15. P. 439–445.
29. Berks B.C. // *Mol. Microbiol.* 1996. V. 22. P. 393–404.
30. Ignatova Z., Hornle C., Nurk A., et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002. V. 291. P. 146–149.
31. Kasche V., Ignatova Z., Markl H., et al. // *Biotechnol. Prog.* 2005. V. 21. P. 432–438.
32. Chou C.P., Yu C.C., Tseng J.H., et al. // *Biotechnol. Bioeng.* 1999. V. 63. P. 263–272.
33. Cai G., Zhu S., Yang S., et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2004. V. 70. P. 2764–2770.
34. Zhang L.F., Li Z.W., Zhang Q.J. // *Chin. J. Biotechnol.* 1991. V. 7. P. 63–72.
35. Martin L., Prieto M.A., Cortes E., et al. // *FEMS Microbiol. Lett.* 1995. V. 125. P. 287–292.
36. Polderman-Tijmes J.J., Jekel P.A., de Vries E.J., et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2002. V. 68. P. 211–218.
37. Kang H.K., Park J.Y., Ahn J.S., et al. // *J. Microbiol. Biotechnol.* 2009. V. 19. P. 172–177.
38. Lu Y., Chi X., Yang Q., et al. // *Extremophiles.* 2009. V. 13. P. 875–884.
39. Lu Y., Zhao H., Zhang C., et al. // *Biotechnol. Lett.* 2009. V. 31. P. 1525–1530.
40. Madhavan A., Tamalampudi S., Ushida K., et al. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009. V. 82. P. 1067–1078.
41. Karimi M., De Meyer B., Hilson P. // *Trends. Plant. Sci.* 2005. V. 10. P. 103–105.
42. Karimi M., Depicker A., Hilson P. // *Plant. Physiol.* 2007. V. 145. P. 1144–1154.
43. Sando T., Takeno S., Watanabe N. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2008. V. 72. P. 2903–2917.
44. Cao Y., Lu Z., Sun P., et al. // *Wei Sheng Wu Xue Bao.* 2008. V. 48. P. 312–316.
45. Khodabandehloo M., Shamsi Shahrabadi M., Keyvani H. // *Iran Biomed. J.* 2009. V. 13. P. 9–18.
46. Liu Z., Yang G., Li B. // *Mol. Biotechnol.* 2003. V. 24. P. 21–26.
47. Liu Z., Yang G.Z., Chi C.W., et al. // *Protein. Pept. Lett.* 2002. V. 9. P. 419–426.
48. Farrokhi N., Hrmova M., Burton R.A., et al. // *Methods Mol. Biol.* 2009. V. 513. P. 175–198.
49. Schwarz D., Dotsch V., Bernhard F. // *Proteomics.* 2008. V. 8. P. 3933–3946.
50. Schwarz D., Junge F., Durst F., et al. // *Nat. Protoc.* 2007. V. 2. P. 2945–2957.
51. Спирин А.С. // *Биоорганическая химия.* 1992. Т. 18. С. 1394–1402.
52. Oh S.J., Kim Y.C., Park Y.W., et al. // *Gene.* 1987. V. 56. P. 87–97.
53. Chou C.P., Kuo B.Y., Lin W.J. // *J. Biosci. Bioeng.* 1999. V. 88. P. 160–167.
54. Ohashi H., Katsuta Y., Nagashima M., et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1989. V. 55. P. 1351–1356.
55. Daumy G.O., Williams J.A., McColl A.S., et al. // *J. Bacteriol.* 1986. V. 168. P. 431–433.
56. Barbero J.L., Buesa J.M., Gonzalez de Buitrago G., et al. // *Gene.* 1986. V. 49. P. 69–80.
57. Meevootisom V., Somsuk P., Prachaktam R., et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1983. V. 46. P. 1227–1229.
58. Dai M., Zhu Y., Yang Y., et al. // *Eur. J. Biochem.* 2001. V. 268. P. 1298–1303.
59. Ignatova Z., Mahsunah A., Georgieva M., et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. V. 69. P. 1237–1245.
60. Jiang Y.M., Tong W.Y., Wei D.Z. // *Biotechnol. Prog.* 2007. V. 23. P. 1031–1037.
61. Norris V., Grant S., Freestone P., et al. // *J. Bacteriol.* 1996. V. 178. P. 3677–3682.
62. Scherrer S., Robas N., Zouheiry H., et al. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1994. V. 42. P. 85–91.
63. Xu Y., Rosenkranz S., Weng C.L., et al. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006. V. 72. P. 529–536.
64. Berks B.C., Sargent F., Palmer T. // *Mol. Microbiol.* 2000. V. 35. P. 260–274.
65. Narayanan N., Xu Y., Chou C.P. // *Biotechnol. Prog.* 2006. V. 22. P. 1518–1523.
66. Xu Y., Weng C.L., Narayanan N., et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. V. 71. P. 6247–6253.
67. Maresova H., Stepanek V., Kyslik P. // *Biotechnol. Bioeng.* 2001. V. 75. P. 46–52.
68. Sriubolmas N., Panbangred W., Sriurairatana S., et al. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1997. V. 47. P. 373–378.
69. Vohra P.K., Sharma R., Kashyap D.R., et al. // *Biotechnol. Lett.* 2001. V. 23. P. 531–535.
70. De Leon A., Breceda G.B., Barba de la Rosa A.P., et al. // *Biotechnol. Lett.* 2003. V. 25. P. 1397–1402.
71. Huang S.W., Lin Y.H., Chin H.L., et al. // *Biotechnol. Prog.* 2002. V. 18. P. 668–671.
72. Deak P.M., Lutz-Wahl S., Bothe H., et al. // *Biotechnol. Lett.* 2003. V. 25. P. 397–400.
73. Oinonen S., Rouvinen J. // *Protein. Sci.* 2000. V. 9. P. 2329–2337.
74. Швядас В.К., Марголин А.Л., Шерстюк С.Ф. и др. // *Биоорганическая химия.* 1977. Т. 3. С. 546–554.
75. Brannigan J.A., Dodson G., Duggleby H.J. // *Nature.* 1995. V. 378. P. 416–419.
76. Alkema W.B., Hensgens C.M., Snijder H.J., et al. // *Protein. Eng. Des. Sel.* 2004. V. 17. P. 473–480.
77. Alkema W.B., Prins A.K., de Vries E., et al. // *Biochem. J.* 2002. V. 365. P. 303–309.
78. McVey C.E., Walsh M.A., Dodson G.G., et al. // *J. Mol. Biol.* 2001. V. 313. P. 139–150.
79. Alkema W.B., Hensgens C.M., Kroezinga E.H., et al. // *Protein. Eng.* 2000. V. 13. P. 857–863.
80. Done S.H., Brannigan J.A., Moody P.C., et al. // *J. Mol. Biol.* 1998. V. 284. P. 463–475.
81. Golobov M.Yu., Borisov I.L., Švedas V.K. // *J. Theor. Biol.* 1989. V. 140. P. 193–204.
82. Youshko M.I., Bukhanov A.L., Švedas V.K. // *Biochemistry (Moscow).* 2003. V. 68. № 3. P. 334–338.
83. Jager S.A.W., Jekel P.A., Janssen D.B. // *Enzyme Microb. Technol.* 2007. V. 40. P. 1335–1344.
84. Gabor E.M., Janssen D.B. // *Protein Eng. Des. Sel.* 2004. V. 17. P. 571–579.
85. Margolin A.L., Svedas V.K., Berezin I.V., et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1980. V. 616. P. 283–289.
86. Guranda D.T., van Langen L.M., van Rantwijk F., et al. // *Tetrahedron. Asym.* 2001. V. 12. P. 1645–1650.
87. Oh B., Kim K., Park J., et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004. V. 319. P. 486–492.
88. Alkema W.B., Dijkhuis A.J., De Vries E., et al. // *Eur. J. Biochem.* 2002. V. 269. P. 2093–2100.
89. Jager S.A., Shapovalova I.V., Jekel P.A., et al. // *J. Biotechnol.* 2008. V. 133. P. 18–26.
90. Шаповалова И.В., Алкема В.Б.Л., Ямскова О.В. и др. // *Acta Naturae.* 2009. Т. 1. С. 102–109.
91. Flores G., Soberon X., Osuna J. // *Protein Sci.* 2004. V. 13. P. 1677–1683.
92. Wang T., Zhu H., Ma X., et al. // *Protein. Pept. Lett.* 2006. V. 13. P. 177–183.

УДК 577.112.017

PEDF – неингибиторный серпин с нейропротекторной и антиангиогенной активностями

Н. И. Минкевич, В. М. Липкин, И. А. Костанян*

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

*E-mail: iakost@mx.ibch.ru

Поступила в редакцию 29.06.2010 г.

РЕФЕРАТ Фактор дифференцировки из пигментного эпителия PEDF (Pigment epithelium-derived factor), гликопротеин с молекулярной массой 50 кДа принадлежит к семейству неингибиторных серпинов. PEDF регулирует большое число физиологических процессов: стимулирует дифференцировку клеток ретинобластомы в нейроны, потенцирует рост и жизнеспособность фоторецепторных клеток и нейронов центральной нервной системы. Более того, этот фактор защищает нейрональные клетки от апоптоза. PEDF является не только нейротрофным фактором, но и природным ингибитором ангиогенеза. Точные молекулярные механизмы действия PEDF в настоящее время еще не полностью ясны. Тем не менее, учитывая огромный нейропротекторный, нейротрофный и антиангиогенезный потенциал PEDF, а также его биологически активных фрагментов, к этому белку проявляется огромный интерес исследователей как к перспективному препарату для терапии широкого спектра нейродегенеративных, офтальмологических и онкологических заболеваний. В обзоре суммированы современные данные о структурных особенностях, биохимических свойствах PEDF, его многомодалных функциях.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА PEDF (pigment epithelium-derived factor, фактор дифференцировки из пигментного эпителия), серпин, нейротрофный фактор, ангиогенез.

ВВЕДЕНИЕ

Фактор PEDF (Pigment Epithelium-Derived Factor – фактор дифференцировки из пигментного эпителия) был впервые идентифицирован в 1989 г. группой американских исследователей под руководством L.V. Johnson в культуральной среде клеток пигментного эпителия сетчатки глаза, выделенных из плода человека [1, 2]. При изучении действия данной среды на клетки ретинобластомы линии Y-79 было обнаружено, что она вызывает остановку неограниченного роста и деления клеток. При этом более 90% клеток приобретают морфологические и биохимические характеристики зрелых нейронов [1]. С помощью электрофоретических и хроматографических методов из культуральной среды был выделен белок с молекулярной массой около 50 кДа, обладающий указанным действием на клетки Y-79. Как было установлено позднее, PEDF человека состоит из одной полипептидной цепи, содержащей 418 а.о. (рис. 1) [3].

Практически одновременно PEDF был выделен из культуры легочных фибробластоподобных клеток человека линии WI-38 [4]. Был также обнаружен и его

мышинный аналог, каспин [5]. Степень гомологии кДНК человеческого PEDF и каспина составляет 82.7%, а их аминокислотных последовательностей – 85.6%.

К настоящему времени известно, что PEDF экспрессируется почти во всех тканях млекопитающих и птиц и выполняет множество функций. К их числу относятся: дифференцирующее действие на эмбриональные и опухолевые клетки; протекторное действие на зрелые нейроны и другие клетки, входящие в состав нервной ткани; антиангиогенная активность – способность ингибировать образование новых сосудов. Поэтому данный белок представляет большой интерес как регуляторный фактор развития клеток и тканей.

ОСОБЕННОСТИ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ PEDF И КОДИРУЮЩЕГО ЕГО ГЕНА

Ген PEDF человека и кодируемый им белок

Ген *pedf* человека локализован в коротком плече хромосомы 17 на его дистальном участке – 17p13.3 [6, 7]. Он имеет длину около 16 т.п.н. и включает в себя 8 эк-



Рис. 1. Аминокислотная последовательность фактора PEDF. Жирным красным шрифтом выделена связь Leu382–Thr383. Желтым фоном – серпиновая петля, голубым – сайт N-гликозилирования. Зеленым – пептид, ответственный за антиангиогенную функцию; сиреневым – пептид, ответственный за нейротрофную функцию. Серым – сайты фосфорилирования. Синим – кластер отрицательно заряженных аминокислот, коричневым – положительно заряженных аминокислот.

зонов, разделенных 7 интронами. Экзон-интронные контакты подчиняются консенсусному правилу GC/AG. Длина экзонов варьирует от 92 до 377 п.н. Промоторный регион гена расположен в 5'-фланкирующей области; при этом СААТ-блок находится в позиции -43 относительно точки инициации транскрипции. В 5'-концевой области гена *pedf*, вплоть до -5 т.п.н., находится кластер Alu-повторов, включающий 8 полных и 3 частичных Alu-элемента [8].

Ген *pedf* кодирует последовательность из 418 а.о. [3]. В N-концевой части PEDF, сразу после инициаторного метионина, находится 17-членный гидрофобный участок с последовательностью, характерной для сигнального фрагмента, обеспечивающего секрецию белка из клетки [3, 9]. Однако, по некоторым данным, последовательность зрелого PEDF, секретируемого из клеток-продуцентов, начинается с позиции Asn21; в соответствии с этим, зрелая полипептидная цепь содержит 398 а.о. [10, 11]. Посттрансляционные модификации PEDF плазмы крови включают N-концевой остаток пироглутаминовой кислоты, образующийся в результате дезаминирования остатка Gln2, и канонический сайт N-гликозилирования -Asn-Leu-Thr- в положениях 285–287. Присоединяемые полисахаридные структуры гетерогенны и имеют молекулярный вес около 4 кДа; их наличие объясняет разницу между расчетной и реальной массами фактора [12]. По данным двумерного электрофореза, секретируемый клетками пигментного эпителия человека PEDF существует в четырех изоформах, изоэлектрические точки которых равны 6.0; 6.2; 6.4 и 6.6 [13].

PEDF – член семейства неингибиторных серпинов

На основании анализа первичной структуры белка и соответствующей ему кДНК, PEDF был отнесен к семейству серпинов – ингибиторов сериновых протеиназ [14]. Гомология аминокислотной последовательности фактора с α_1 -антитрипсином составляет 27% (с учетом равноценных замен – 42%), с α_1 -антихимотрипсином и α_2 -плазминовым ингибитором – 27 и 26% (с учетом равноценных замен – 44 и 43% соответственно) (рис. 2) [3]. Идентичность 51 а.о., необходимых для формирования пространственной структуры серпинового типа [15], в PEDF и других серпинах составляет более 76% [16]. Несмотря на высокую гомологию первичных и третичных

довательности фактора с α_1 -антитрипсином составляет 27% (с учетом равноценных замен – 42%), с α_1 -антихимотрипсином и α_2 -плазминовым ингибитором – 27 и 26% (с учетом равноценных замен – 44 и 43% соответственно) (рис. 2) [3]. Идентичность 51 а.о., необходимых для формирования пространственной структуры серпинового типа [15], в PEDF и других серпинах составляет более 76% [16]. Несмотря на высокую гомологию первичных и третичных

HUMA1AT	MPSSVSWGILLAGLCLVPVSLAEDPQGDAAQKTDTSHHQD--HP
PEDF	MQALVLLLCIGALLGHSSCQNPASPPPEEGSPDPDSTGALVEEEDPFFKV
HUMA1AT	TFNKITPNLAEFAFSLYRQLAHQSNSTNIFSPVSIATAFAMLSLGTKA
PEDF	PVNKLAARVSNFGYDLYRVRSSMSPPTINVLSPISVATALSALS LGADE
HUMA1AT	DTHDEILEGLNFNLTEIPEAQIHEGFQELLRTLNPQDSDLQTLTGNGLF
PEDF	RTESIHRALYDYD--ISSPDIGHYKELLDVTVTAPQNKLSASRIVE
HUMA1AT	LSEGLKLVDFLEVDKVLHYSEAFVNFVGDHEEAKKQINDYVEKGTQGK
PEDF	-EKLRKISSFVAPLEKSYGTRPVLV--GNPRLDLQEI NNWVQAQMKKG
HUMA1AT	IVDLVKELDRDVFALVNYIFFKQKWERPFVVKDTEDEDFHVDQVTTVK
PEDF	LARSTKEIPDEISILLGVAFKXGQWYTKFDSRKTSLDFY LDEERTVR
HUMA1AT	VPMMKRLG-MFNIQHCCKLSSWVLLMKYLG NATAIFFLPDE--GKLQHL
PEDF	VPMSDPKAVLRYGLSDLSCKIAQLPLTGSM SIIFFLPLKVTQNLTLI
HUMA1AT	ENELTHDIITKFLNEDRRSASLHLPKLSITGTVDLKSVLGQLGITKVF
PEDF	EESLTSEF IHDIDRELKTVQAVLTVPKLKS YEGEVTKSLQEMKLSLF
HUMA1AT	SNGADLSGVTEEAPLKLKSKAVHKAVLTIDERGTEAAGAMFLEAIPMSIP
PEDF	-DSPDFSKITGK-PIKLTQVEHRAGFEWNE D GAGTTPSPGLQPAHLTFP
HUMA1AT	PEVKFNKPFVFLMIEQNTKSP LFMGKVVNPTQK
PEDF	LDYHLNQPFIFVLRD TDTGALLFIGKILDPRGP

Рис. 2. Сравнение аминокислотных последовательностей PEDF человека и α_1 -антитрипсина человека (HUMA1AT). Двоеточием отмечены одинаковые аминокислоты, точками – консервативные замены [3].

структур с ингибиторами сериновых протеиназ, сам фактор не является ингибитором этих ферментов [17]. Возможно, это объясняется структурными особенностями экспонированной реакционной петли фактора. Хотя она имеет равную с другими серпинами длину (17 а.о., Glu366-Leu382) [18, 19], в ее составе отсутствуют характерные для ингибиторных серпинов элементы – Ala-обогащенная последовательность (положения в петле с 9 по 12) и Thr в положениях 8 и 14, но присутствуют нехарактерные для них остатки пролина [16].

В структуре PEDF, как и в структурах прочих серпинов, имеется наиболее подверженная протеолизу связь, расположенная в экспонированной в цитоплазму петле [14]. При ограниченном протеолизе PEDF многими сериновыми протеиназами (химотрипсином, эластазой, субтилизином и др.) его молекулярная масса уменьшается примерно на 4 кДа. Установлено, что данные протеиназы гидролизуют связь Leu382-Thr383, что приводит к отделению от молекулы 36-членного фрагмента с С-конца. В отличие от ингибиторных серпинов, ковалентная связь между молекулой PEDF и активным центром протеиназы не образуется. PEDF с отщепленным С-концевым фрагментом в полной мере сохраняет свою способность вызывать дифференцировку клеток линии Y-79 в зрелые нейроны [20].

После отделения 36-членного фрагмента (в результате протеолиза связи Leu382-Thr383) наблюдается уменьшение общей эллиптичности молекулы, что свидетельствует об уменьшении ее α -спиральности. При этом в противоположность ингибиторным серпинам устойчивость молекулы к термической денатурации снижается. Конформационные изменения, однако, не носят глобального характера и затрагивают лишь С-концевую часть молекулы, приближенную к экспонированной петле. Функциональная роль последней, а также отделяемого при ее расщеплении С-концевого фрагмента молекулы PEDF изучены недостаточно. По некоторым данным, остатки, расположенные в этой части молекулы, наряду с N-концевым сигнальным пептидом необходимы для секреции PEDF из клеток.

Удаление фрагментов Pro415-Pro418 и Pro373-Ala380, а также точечные замены какого-либо из остатков Gly376, Leu377, Pro393, Phe394 или Phe396 (первые два расположены в экспонированной петле) приводят к изменению пространственной структуры молекулы или изменению ее взаимодействия с другими белками, предположительно, переносчиками. Нарушается транспорт PEDF из эндоплазматического ретикулума в комплекс Гольджи, вследствие чего он не секретируется [16, 21].

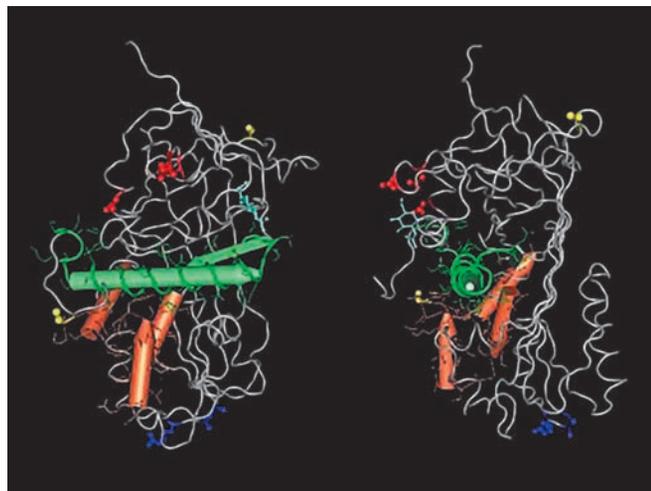


Рис. 3. Трехмерная кристаллическая структура PEDF. Показаны две проекции молекулы по вертикальной оси со сдвигом в 90° . Ответственный за антиангиогенную функцию пептид выделен зеленым, ответственный за нейротрофную функцию – оранжевым. Красным цветом показаны отрицательно заряженные аминокислоты, образующие коллагенсвязывающий кластер, фиолетовым – положительно заряженные, формирующие «ядро» гликозаминогликансвязывающего кластера. Сайты фосфорилирования (Ser114 и Ser227) показаны желтым, сайт гликозилирования Asn285 с присоединенными остатками сахаров – голубым [23].

Пространственная структура PEDF. Асимметричное расположение положительных и отрицательных зарядов в молекуле PEDF

Зрелая молекула фактора представляет собой глобулу с радиусом <3.05 нм. Около 60% а.о. PEDF участвуют в образовании десяти α -спиралей и трех β -слоев [22]. В положениях Ser24, Ser114 и Ser227 находятся сайты фосфорилирования. Фактор содержит две аминокислотные последовательности, 34-членную (Asp34-Asn77) и 44-членную (Val78-Thr121), ответственные за антиангиогенные и нейротрофные взаимодействия соответственно (рис. 3) [23].

Характерной структурной особенностью молекулы PEDF является наличие кластеров положительно и отрицательно заряженных аминокислот, расположенных на разных сторонах глобулы. Они обуславливают способность фактора к электростатическому связыванию с элементами внеклеточного матрикса – гликозаминогликанами и коллагеном [24–25].

Кластер отрицательно заряженных остатков Asp и Glu локализован в двух областях полипептидной цепи, расположенных на поверхности глобулы и пространственно сближенных: Glu41-Asp64 (остатки Glu41, Glu42, Glu43, Asp44, Asp64) и Asp256-Glu304

(остатки Asp256, Asp258, Glu290, Glu291, Glu296, Asp300, Glu304). Наличие этого кластера обуславливает сродство PEDF к коллагенам типов I, II и III [25]. Связывание PEDF как с коллагенами, так и с гликозаминогликанами, имея электростатическую природу, ослабляется при повышении ионной силы окружающей среды. Пептидные фрагменты Val40-Arg67 и Phe277-Phe301, участвующие в образовании кластера, эволюционно чрезвычайно консервативны от млекопитающих до рыб [16].

Кластер положительно заряженных аминокислот, включающий 12 остатков Arg, Lys и His, расположен в области Lys134-Lys214. Остатки Lys134, Lys137, Lys189, Lys191, His212 и Lys214 формируют «ядро» кластера, остатки Arg141, Lys146, Lys147, Arg149, Arg165, Arg167 расположены по его краям. За счет локального положительного заряда молекула PEDF способна связываться с полианионными матрицами, богатыми отрицательно заряженными сульфогруппами – гепарином, хондроитинсульфатом и др. Данный кластер принимает участие во взаимодействии PEDF с гликозаминогликанами интерфоторецепторного матрикса сетчатки [24].

Помимо цитоплазмы, PEDF был обнаружен во внутриядерном пространстве. По всей вероятности, положительно заряженный фрагмент фактора Lys146-Arg149 может представлять собой сигнал внутриядерной локализации. Следует отметить, что только 10 из 6000 изученных белков, подобно PEDF, имеют С-концевой сайт гликозилирования; при этом все они – ядерные белки [16]. Возможно, PEDF в качестве ядерного белка принимает участие в регулировании клеточного цикла.

Заряды расположены на поверхности молекулы PEDF асимметрично – кластеры кислых и основных аминокислот находятся на противоположных сторонах глобулы. Это обеспечивает PEDF возможность взаимодействовать с гликозаминогликанами и коллагеном одновременно. Взаимодействие с гликозаминогликанами усиливает сродство PEDF к коллагену и наоборот [25]. Таким образом, PEDF способен к модуляции процессов клеточной адгезии, включающих в себя интегрин-коллагеновое взаимодействие. Поскольку клеточная адгезия является одной из ключевых стадий ангиогенеза, этим может объясняться антиангиогенное действие фактора [25].

Степень фосфорилирования молекулы PEDF влияет на его антиангиогенную и нейротрофную активности

На поверхности молекулы PEDF расположены три сайта фосфорилирования (Ser24, Ser114 и Ser227). Выделяемый из плазмы крови человека фактор является фосфопротеином. Фосфорилирование осуществ-

ляется в процессе циркуляции фактора в крови ферментами казеинкиназой 2 и протеинкиназой А [26]. Казеинкиназа 2 фосфорилирует фактор по остаткам Ser24 и Ser114, протеинкиназа А – по единственному остатку Ser227. Показано, что фосфорилирование PEDF обеими киназами существенно влияет на его физиологические функции. Фосфорилированный только по сайтам казеинкиназы 2 фактор имеет сниженную нейротрофную активность; при этом его антиангиогенная активность значительно повышена. Фосфорилированный только протеинкиназой А фактор имеет сниженную антиангиогенную и практически не измененную нейротрофную активности. Полностью фосфорилированный фактор имеет высокие и антиангиогенную, и нейротрофную активности. При добавлении к отрицательному заряду, образовавшемуся в результате фосфорилирования фактора казеинкиназой 2, отрицательного заряда в сайте фосфорилирования протеинкиназой А усиливается способность фактора ингибировать клеточную пролиферацию. Следует отметить, что в составе PEDF имеются и другие потенциальные сайты фосфорилирования, однако при нормальном фолдинге молекулы они остаются недоступными для киназ.

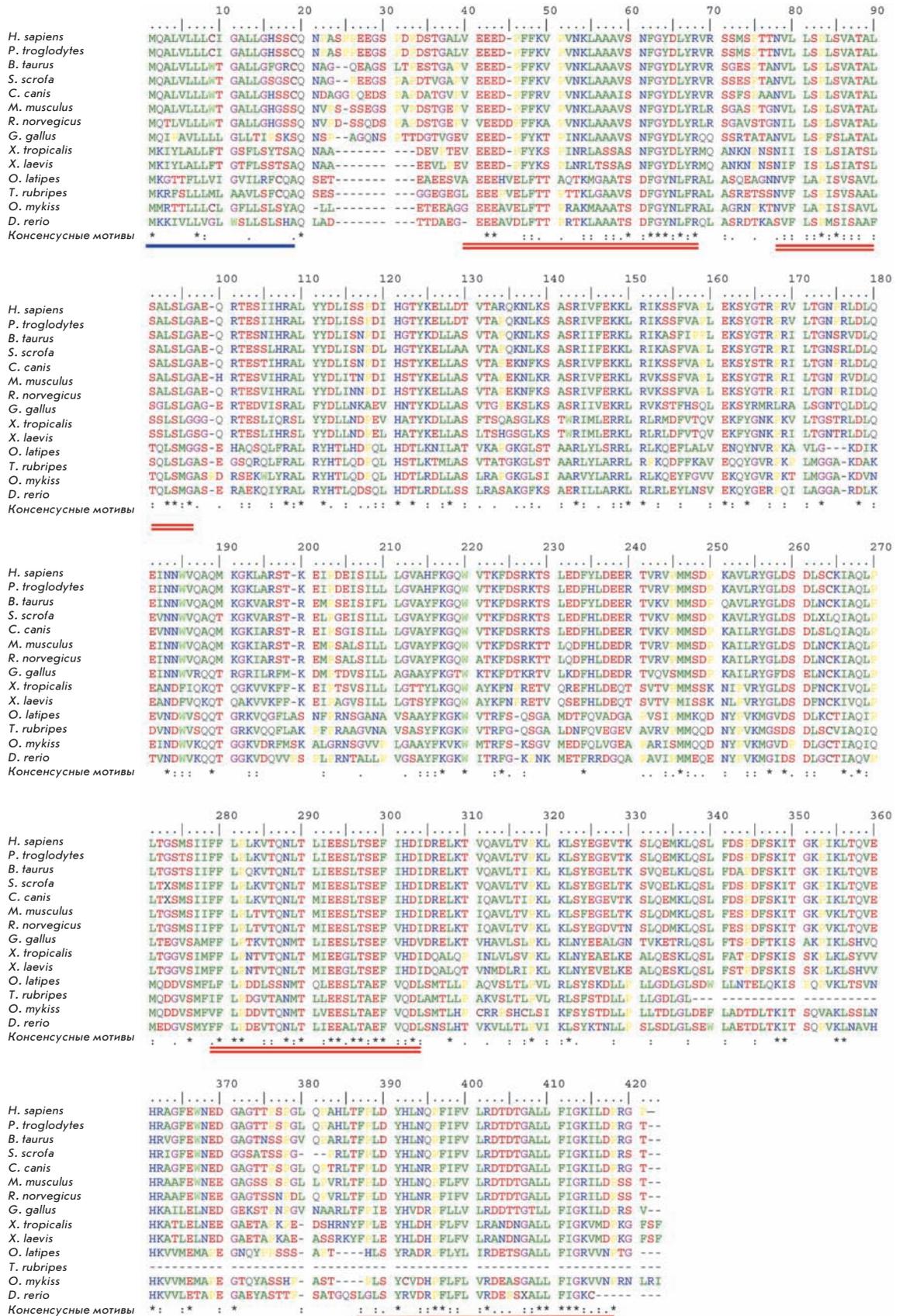
Фосфорилирование по сайтам казеинкиназы 2 предотвращает возможное модифицирование третьего сайта протеинкиназой А, в то время как фосфорилирование по Ser227 никак не влияет на взаимодействие PEDF с казеинкиназой 2. Потеря протеинкиназой А способности взаимодействовать с фактором при уже фосфорилированных Ser24 и Ser114 объясняется конформационной маскировкой Ser227 при фосфорилировании сайтов казеинкиназы 2, несмотря на то, что эти два сайта расположены в разных областях молекулы [27].

Распространенность и эволюционная консервативность фактора PEDF

Ген *pedf* эволюционно консервативен – он присутствует в геномах различных видов от человека до рыб (рис. 4, 5) [16].

Методом ДНК-РНК-гибридизации установлено наличие мРНК PEDF почти во всех из 44 исследованных тканей взрослого человека и человеческого эмбриона. Предположительно, PEDF экспрессируется главным образом теми типами клеток, которые не утратили способность к делению *in vivo* [28]. В различных отделах глаза и слоях сетчатки взрослого человека и эмбриона антитела к полипептиду PEDF взаимодействовали с цитоплазмой развивающихся фоторецепторов, глиальным слоем, отдельными клетками слоя нейробластов и пигментными гранулами клеток пигментного эпителия с 8-й недели эмбрионального развития. У взрослого организма они

Рис. 4. Сравнение аминокислотных последовательностей фактора PEDF. Четырнадцать последовательностей фактора разных биологических видов (человек, *Homo sapiens*; шимпанзе, *Pan troglodytes*; бык, *Bos taurus*; свинья, *Sus scrofa*; собака, *Canis canis*; мышь, *Mus musculus*; крыса, *Rattus norvegicus*; курица, *Gallus gallus*; тропическая лягушка, *Xenopus tropicalis*; шпорцевая лягушка, *Xenopus laevis*; японская рисовая рыбка, *Oryzias latipes*; рыба фуру, *Takifugu rubripes*; радужная форель, *Micropterus salmoides*; микийси, *Danio rerio*) проанализированы с помощью программы ClustalW. Звездочкой отмечены позиции, занимаемые полностью консервативным остатком. Двоеточие – консервативна одна из «сильных» функциональных групп; точка – консервативна одна из «слабых» групп. Синей линией обозначена лидерная последовательность PEDF. Двойной красной линией выделены области высокой консервативности между всеми последовательностями PEDF. Проверки использованы для максимального выравнивания последовательностей [16].



	Hs	Chimp	Bt	Pig	Dog	Mm	Rt	Chick	Xt	Xl	Fugu	Trout	Zebra
Hs	100												
Chimp	99	100											
Bt	87	88	100										
Pig	88	88	90	100									
Dog	90	90	87	88	100								
Mm	86	85	84	84	87	100							
Rt	83	83	82	82	87	93	100						
Chick	63	63	63	63	62	63	63	100					
Xt	55	55	55	56	56	56	56	55	100				
Xl	56	57	57	58	57	57	56	53	89	100			
Fugu	34	35	36	36	36	36	35	35	34	35	100		
Trout	37	37	39	38	36	37	37	39	38	38	64	100	
Zebra	40	40	41	41	41	40	39	42	41	40	56	65	100

Рис. 5. Межвидовая гомология аминокислотных последовательностей фактора PEDF в процентах. Таблица получена с помощью программы PSI- Blast [16].

взаимодействовали с ядрами палочек (но не колбочек), цитоплазмой некоторых клеток во внутреннем ядерном и глиальном слоях, с клетками пигментного эпителия, хориокапиллярным слоем роговицы, зрачком, а также цилиарным эпителием [29].

Наибольшей видовой консервативностью среди пептидных фрагментов фактора обладают следующие последовательности [16]. Эволюционно консервативен лидерный N-концевой участок фактора, ответственный за секрецию PEDF из клетки [30]. Высоко консервативна последовательность Asn285-X-Thr287, являющаяся сайтом N-гликозирования. Также консервативными участками являются четыре пептидных фрагмента, два из которых уникальны для PEDF и образуют кластер отрицательно заряженных аминокислот, а два других (в положениях Val78-Gly95 и Phe384-Pro415) имеют высокую гомологию с другими серпинами. Видимо, присущие им функции фундаментальны для всех серпинов.

ЭФФЕКТЫ, ОКАЗЫВАЕМЫЕ PEDF НА КЛЕТКИ И ТКАНИ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Дифференцирующее действие PEDF и его влияние на метаболизм

Дифференцирующее действие нейротрофного фактора PEDF было показано и изучено на тканях нейрального происхождения – как на эмбриональных (незрелые нейроны, развивающиеся фоторецепто-

ры) [31, 32], так и на опухолевых (нейробластома, ретинобластома, карцинома) [3, 33, 34]. Человеческий и бычий PEDF оказывают дифференцирующее действие *in vitro* на клетки культуры незрелых двигательных нейронов спинного мозга, выделенных из эмбрионов цыплят в возрасте 5.5 сут [35]. PEDF – основной фактор, обеспечивающий нормальный морфогенез и метаболизм фоторецепторных и глиальных клеток при эмбриональном развитии сетчатки глаза [32, 36, 37].

PEDF оказывает дифференцирующее и антипролиферативное воздействие на клетки ретинобластомы линии Y-79 [1, 3]. Противоопухолевое действие фактора распространяется и на нейробластома. При этом заболевании клинический прогноз бывает тем лучше, чем больше в популяции дифференцированных нейронов и Шванновских клеток, культуральная среда которых обладает противоопухолевыми свойствами [38]. Именно PEDF, являющийся секреторным продуктом Шванновских клеток, определяет противоопухолевые свойства их культуральной среды [33].

PEDF оказывает противоопухолевое действие на карциному эпителия яичников, являющуюся наиболее летальной из гинекологических раковых опухолей. Уровень экспрессии PEDF в раковых опухолях яичников и их клеточных линиях значительно снижен по сравнению с нормальным эпителием яичников. Экзогенный PEDF ингибирует рост клеток

линий нормального и ракового эпителия яичников, в то время как снижение активности эндогенного PEDF путем введения ингибиторов усиливает рост этих клеток.

Действие PEDF в клетках эпителия яичников в значительной степени регулируется эстрогенами. Обработка культивируемых клеток 17β -эстрадиолом снижает экспрессию фактора и его мРНК, угнетая транскрипцию гена *pedf*. В регуляции принимает участие рецептор эстрогена. 17β -Эстрадиол способствует росту нормальных и раковых клеточных линий эпителия яичников, в то время как совместная обработка 17β -эстрадиолом и PEDF отменяет ростовое стимулирование [34].

В некоторых линиях клеток карциномы яичника делетирован участок 17-й хромосомы 17p13.3, имеющий длину 15 т.п.н. и включающий в себя почти весь ген *pedf* [39]. На эти клеточные линии 17β -эстрадиол не оказывает пролиферативного воздействия, что позволяет предположить делецию участка его воздействия, расположенного в 5'-фланкирующей области гена фактора. Эпигенетические изменения, такие, как гиперметилирование промотора, могут служить альтернативным механизмом регуляции уровня экспрессии фактора [34].

PEDF в клетках пигментного эпителия стимулирует синтез и накопление меланина [40], о важности которого в развитии нейронов сетчатки свидетельствует тот факт, что все млекопитающие альбиносы независимо от причин альбинизма имеют те или иные нарушения передачи зрительного сигнала [41]. Фактор также повышает активность промотора гена тирозиназы – фермента, ответственного за синтез меланина [42].

Нейропротекторное действие PEDF

Показана способность PEDF предотвращать апоптотическую гибель клеток культуры сетчаточных нейронов под действием H_2O_2 [43]. Предварительная обработка фактором защищает пигментный эпителий от вызываемых H_2O_2 нарушений его барьерных функций. Он также предохраняет клетки от вызываемых перекисью водорода перераспределения синаптических белков окклюдина и N-кадгерина в составе клеточных мембран пигментного эпителия, от реорганизации актина и активации сигнального каскада белка теплового шока p38/27-кДа, который ее опосредует [44].

Фактор оказывает протекторное действие на культуру первичных гранулярных клеток мозжечка, выделенных из 8-дневных крысят, значительно замедляя апоптоз клеток этой культуры, происходящий спонтанно или же вызванный депривацией сыворотки [45, 46]. Также PEDF предохраняет грануляр-

ные клетки мозжечка [47], нейроны гиппокампа [48] и двигательные нейроны спинного мозга [49] от токсического действия глутамата. По некоторым данным, основой механизма антиапоптотического действия PEDF на гранулярные клетки является активация транскрипционного фактора NF- κ B [50].

Антиангиогенное действие PEDF

PEDF является одним из наиболее мощных антиангиогенных факторов. Он ингибирует рост сосудов в роговице крысы, стимулированный сильнейшим ангиогенным фактором – bFGF. Действующая концентрация PEDF меньше, чем для наиболее мощных из известных антиангиогенных агентов – ангиостатина, эндостатина и тромбоспондина [51]. Фактор участвует в комплексном сбалансированном контроле ангиогенеза, противодействуя эффекту ангиогенных факторов, прежде всего VEGF (vascular endothelial growth factor) и bFGF (basic fibroblast growth factor) [52–55].

Насыщение тканей кислородом влияет на концентрацию PEDF. При гипероксигенации у животных формируется сетчатка с пониженным количеством сосудов, при этом уровень экспрессии PEDF оказывается повышенным [56]. Гипероксигенация стимулирует выработку фактора; гипоксия, напротив, угнетает ее.

В настоящее время выясняется механизм антиангиогенного эффекта PEDF. Эндотелиальные клетки обладают положительным хемотаксисом в отношении ангиогенных факторов. Соответственно один из предположительных механизмов такого действия PEDF заключается в ингибировании хемотаксиса эндотелиальных клеток, образующих стенки кровеносных сосудов, по отношению ко всем исследованным ангиогенным факторам – VEGF, PDGF, IL-8 и др. [51].

По другим данным, причиной антиангиогенного эффекта PEDF является апоптоз эндотелиальных клеток [57]. Характерной особенностью фактора является селективное влияние только на развивающиеся сосуды, повреждения уже существующих он не вызывает [58]. Причиной такого избирательного действия служит инициация апоптоза, опосредованная Fas-лигандом [59]. Ангиогенные агенты стимулируют экспрессию эндотелиальными клетками ряда антиапоптотических молекул, повышающих их жизнеспособность [60], а также экспрессию Fas-рецепторов. Показано, что PEDF индуцирует выработку эндотелиальными клетками Fas-лигандов, что при наличии достаточной плотности Fas-рецепторов ведет к Fas-индуцированному апоптозу клеток развивающихся сосудов [59]. В сформированных же сосудах клетки эндотелия находятся в состоянии «ростового запрета» и в плотном контакте друг с другом; экспрессия

Fas-рецепторов в них снижена [61], что делает их защищенными от апоптотического действия PEDF.

Однако, помимо того что PEDF может вызывать апоптоз путем увеличения экспрессии Fas/FasL, должны быть дополнительные способы его воздействия на клетки, так как оно сохраняется у нокаутных по Fas и FasL мышей [57, 62, 63]. Показано, что PEDF способен активировать p38 MAPK в культуре эпителиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC), способствуя их фосфорилированию. Активация p38 приводит к дальнейшей активации каспаз 3, 8 и 9 и апоптотической гибели клетки [64].

Следует отметить, что фактор VEGF тоже способствует фосфорилированию p38, причем при совместной обработке с PEDF происходит потенцирование эффекта. Одной из важнейших функций VEGF является защита эндотелиальных клеток от апоптоза, в том числе и в условиях обеднения среды. Активация киназы p38 VEGF связана с регуляцией ее транскрипции [65, 66], реорганизацией цитоскелета и миграцией клеток [67]. Представляется вероятным, что пороговая концентрация фосфорилированной p38 MAPK, необходимая для проявления проангиогенных эффектов, ниже концентрации, требуемой для активизации клеточной гибели. Опосредованное PEDF повышение уровня содержания активированной p38 может приводить к превышению апоптотической пороговой концентрации белка и гибели клетки [64].

Стимулируя апоптоз эндотелиальных клеток, PEDF в то же время предотвращает апоптоз различных клеток нейрального происхождения. На эндотелиальные клетки разных фенотипов PEDF может оказывать и противоположное по характеру воздействие [68]. Вероятно, в таких случаях действие фактора реализуется по разным, не связанным между собой механизмам.

РЕЦЕПТОР PEDF

Разнообразные функции PEDF, очевидно, реализуются по разным механизмам. Однако представляется вероятным, что в большинстве случаев взаимодействие PEDF с клеткой идет по лиганд-рецепторному типу; эффекты фактора блокируются антителами-антагонистами связывания с клеточной поверхностью [47, 69, 70].

Недавно в клетках сетчатки глаза методом двухгибридной системы был идентифицирован ген [72], белковый продукт которого представляет собой рецептор PEDF, названный PEDF-R. Ген локализован на участке 11p15.5 11 хромосомы и содержит 10 экзонов и 9 интронов. мРНК транскрипты *pedf-r* содержат 2122 основания. Они кодируют белковую последовательность из 504 аминокислот (масса

55.315 кДа), содержащую четыре консенсусных сайта N-гликозилирования. Экспрессируемый в эукариотических системах рецептор имеет массу около 81 кДа, близкую к массе ранее идентифицированных в клетках линии ретинобластомы человека Y-79, а также в гранулярных нейронах мозжечка крысы и в сетчатке быка, PEDF-связывающих белков клеточной поверхности [70, 71].

Рецептор встречается главным образом в клетках ретинального пигментного эпителия, на внутренних сегментах фоторецепторов и нейрональных клетках сетчатки, хотя во внешних сегментах палочек он не обнаружен. Помимо нормального ретинального пигментного эпителия, PEDF-R присутствует также в ряде других тканей и органов – в оптическом нерве, сосудистой оболочке глаза, в клетках ретинобластомы и раковых опухолей различного происхождения, а также в клетках мозга животных в условиях истощения серотонина и катехоламинов. Ген рецептора у млекопитающих эволюционно консервативен. Наибольшая его консервативность показана для PEDF-R человека и мыши (89%) и для PEDF-R человека и крысы (также 89%). Гомологичные гену PEDF-R последовательности обнаружены в геномах нематод (*Caenorhabditis elegans*) и комаров (*Anopheles gambiae*).

PEDF-R представляет собой трансмембранный белок, имеющий четыре трансмембранных, два внеклеточных и три внутриклеточных домена; N- и C-концы молекулы экспонированы во внутриклеточное пространство (рис. 6) [72].

PEDF-R способен связываться с PEDF с $K_d \sim 3.03 \pm 0.716$ нМ как в растворе, так и в условиях иммобилизации одного из белков, не теряя эту способность даже после денатурации и рефолдинга. Посттрансляционные модификации, в частности N-гликозилирование, не являются необходимым условием для связывания фактора с ре-

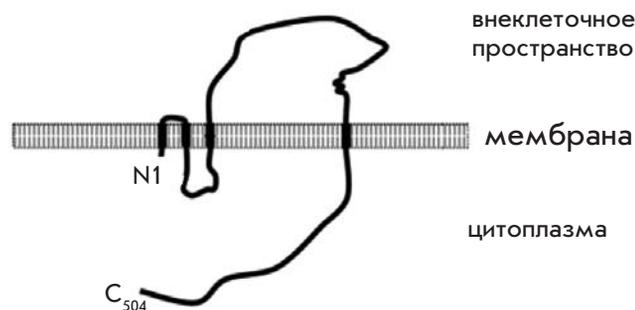


Рис. 6. Прогнозируемая по аминокислотной последовательности топология PEDF-R. Жирными линиями показаны трансмембранные участки [72].

цептором – экспрессированный в бактериальных системах PEDF-R взаимодействует с PEDF с практически неизменной константой диссоциации. Идентифицирован ответственный за связывание фактора фрагмент PEDF-R – 12c (Gln250-Arg383). Показано, что этот фрагмент высокоомологичен коллагену I крысы. Вероятно, однако, что не только этот фрагмент отвечает за связывание PEDF, поскольку фактор взаимодействует с полноразмерным рецептором с более высокой аффинностью, константа диссоциации последнего почти на 2 порядка выше, чем у фрагмента 12c ($K_{d12c} \sim 134$ нМ).

Во взаимодействии фактора с рецептором принимает участие фрагмент молекулы PEDF Val78-Thr121. Его синтетический 44-членный пептидный аналог сохраняет способность связываться с рецептором [70].

Помимо способности связывать PEDF, PEDF-R проявляет фосфолипазную активность и классифицирован как член семейства кальций-независимых фосфолипаз A_2 . В последовательности PEDF-R идентифицировано 2 пространственно сближенных пататин-подобных фрагмента (Asn39-Ala54 и Ser158-Tyr177), образующих каталитическую диаду Ser47/Asp166, присутствующую в активных центрах пататина B_2 и цитозольных фосфолипаз A_2 человека [73].

Фосфолипазы A_2 высвобождают лизофосфолипиды, участвующие в клеточной сигнализации и влияющие на развитие и функционирование всех систем органов млекопитающих [74]. Также фосфолипазы A_2 высвобождают из клеточной мембраны биологически активные жирные кислоты, служащие вторичными мессенджерами или предшественниками эйкозаноидов, опосредующих передачу сигналов [75]. Наиболее часто встречающиеся в мембранах клеток сетчатки и центральной нервной системы арахидоновая и докозагексаеновая кислоты способны влиять на выживаемость клеток сетчатки и нервных клеток [76, 77] и подобно PEDF обладают противоопухолевой и антиангиогенной активностями [78, 79].

PEDF-R способен расщеплять арахидоноил-*sn*-глицерин-3-фосфохолин, высвобождая арахидоновую кислоту [80]; и, хотя в настоящий момент нет эмпирических данных о высвобождении PEDF-R докозагексаеновой кислоты, показано, что PEDF в субнаномолярных концентрациях способен активировать синтез и высвобождение ее производных в клетках линии ARPE-19 человека [81, 82]. Эти данные говорят о том, что PEDF может способствовать выживанию клеток сетчатки посредством влияния на липидные сигнальные пути, связанные с PEDF-R. При взаимодействии PEDF со своим рецептором PEDF-R происходит высвобождение из клеточных мембран жирных кислот и лизофосфолипидов, дей-

ствующих как пара-, так и аутокринно, с одной стороны повышая выживаемость и способность к дифференцировке нейрональных клеток, а с другой вызывая необратимую гибель опухолевых и эндотелиальных клеток [72].

PEDF КАК СУБСТРАТ MMP-2 И MMP-9

Как уже упоминалось выше, регуляция ангиогенеза тесно связана с количественным соотношением между факторами дифференцировки VEGF и PEDF. Показано, что при возрастании концентрации экзогенного PEDF в модели хороидальной неоваскуляризации стимулируется продукция VEGF эндотелиальными клетками. Увеличение концентрации VEGF, в свою очередь, может индуцировать продукцию матриксных металлопротеиназ MMP-2 и -9 (или соответственно желатиназ А и В). Активированные протеиназы расщепляют компоненты внеклеточного матрикса, а также связанный с ними PEDF, не воздействуя при этом на VEGF. Таким образом, в ответ на повышение концентрации PEDF усиливается его инактивация MMP, возрастает соотношение факторов VEGF/PEDF и стимулируется ангиогенез.

Наиболее доступным для протеолиза MMP-2 и -9 сайтом в составе PEDF является участок экспонированной петли, содержащий в своем составе связь Leu382-Thr383. Однако, помимо этой связи, последовательность PEDF содержит ряд частично или полностью “скрытых” третичной структурой сайтов протеолиза MMP-2 и -9, в меньшей степени доступных для атаки матриксными металлопротеиназами. Вероятно, в результате действия MMP-2 и/или -9 происходит постепенная потеря третичной структуры молекулы PEDF, что делает доступными для металлопротеиназ дополнительные внутренние связи. При полном протеолизе образуется множество пептидных продуктов, которые не проявляют антиангиогенной и нейротрофной активностей, хотя сохраняют способность связываться с внеклеточным матриксом. Таким образом, матриксные металлопротеиназы могут инактивировать PEDF тем же путем, что и в случае ингибиторных серпинов (например, антитрипсина и антитромбина III), действуя на реакционный центр петли и, предположительно, образуя с молекулой фактора устойчивый неактивный комплекс (хотя существование такого комплекса пока не обнаружено). Однако нельзя исключить возможность, что потеря PEDF его биологических активностей достигается путем постепенного полного протеолиза белка [83].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Белок PEDF интенсивно изучается в течение ряда лет, причем с каждым годом число этих исследований возрастает. Выявлено, что этот белок является

регулятором широкого спектра процессов, происходящих в клетках и тканях различных эукариотических организмов, в том числе человека. PEDF находится в центре внутриклеточных взаимодействий высокого уровня, и, возможно, еще не все узлы метаболических путей клетки, в которых он участвует, выявлены. Антипролиферативная, антиангиогенная, протекторная, дифференцирующая и другие активности PEDF представляют чрезвычайный интерес

не только с точки зрения фундаментальной науки, но и в свете возможного терапевтического использования этого белка при лечении различных заболеваний, в том числе нейродегенеративных поражений зрительной и нервной систем, а также опухолевых процессов. ●

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Tombran-Tink J, Johnson L.V. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1989. V. 30. P. 1700–1707.
- Tombran-Tink J, Chader G.J., Johnson L.V. // Exp. Eye Res. 1991. V. 53. P. 411–414.
- Steele F., Chader G.J., Johnson L.V., Tombran-Tink J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P. 1526–1530.
- Pignolo R.J., Cristofalo V.J., Rotenberg M.O. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 8949–8957.
- Kozaki K., Miyaishi O., Koiwai O., et al. // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. P. 15125–15130.
- Tombran-Tink J., Pawar H., Swaroop A., et al. // Genomics. 1994. V. 19. P. 266–272.
- Goliath R., Tombran-Tink J., Rodriguez I.R., et al. // Mol. Vis. 1996. V. 2. P. 5.
- Tombran-Tink J., Mazuruk K., Rodriguez I., et al. // Mol. Vis. 1996. V. 2. P. 11.
- von Heijne G. // Nucleic Acids Res. 1986. V. 14. P. 4683–4690.
- Stratikos E., Alberdi E., Gettins P.G., Becerra S.P. // Protein Sci. 1996. V. 5. P. 2575–2582.
- Ortego J., Escribano J., Becerra S.P., et al. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1996. V. 37. P. 2759–2767.
- Petersen S.V., Valnickova Z., Enghild J.J. // Biochem. J. 2003. V. 374. P. 199–206.
- Tombran-Tink J., Shivaram S.M., Chader G.J., et al. // J. Neurosci. 1995. V. 15. P. 4992–5003.
- Carrell R.W., Pemberton P.A., Boswell D.R. // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1987. V. 52. P. 527–535.
- Irving J.A., Pike R.N., Lesk A.M., Whisstock J.C. // Genome Res. 2000. V. 10. P. 1845–1864.
- Tombran-Tink J., Aparicio S., Xu X., et al. // J. Struct. Biol. 2005. V. 151. P. 130–150.
- Becerra S.P., Palmer I., Kumar A., et al. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 23148–23156.
- Huber R., Carrell R.W. // Biochemistry. 1989. V. 28. P. 8951–8966.
- Zhou A., Carrell R.W., Huntington J.A. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 27541–27547.
- Becerra S.P., Sagasti A., Spinella P., Notario V. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 25992–25999.
- Shao H., Schwartz I., Shaltiel S. // Eur. J. Biochem. 2003. V. 270. P. 822–831.
- Simonovic M., Gettins P.G.W., Volz K. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. P. 11131–11135.
- Becerra S.P. // Exp. Eye Res. 2006. V. 82. P. 739–740.
- Alberdi E., Hyde C.C., Becerra S.P. // Biochemistry. 1998. V. 37. P. 10643–10652.
- Meyer C., Notari L., Becerra S.P. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 45400–45407.
- Maik-Rachline G., Shaltiel S., Seger R. // Blood. 2005. V. 105. P. 670–678.
- Gettins P.G., Simonovic M., Volz K. // Biol. Chem. 2002. V. 383. P. 1677–1682.
- Pignolo R.J., Rotenberg M.O., Cristofalo V.J. // J. Cell. Physiol. 1995. V. 162. P. 110–118.
- Karakousis P., John C., Behling K., et al. // Mol. Vis. 2001. V. 7. P. 154–163.
- Tombran-Tink J., Shivaram S.M., Chader G.J., et al. // J. Neurosci. 1995. V. 15. P. 4992–5003.
- Isobe M., Emanuel B.S., Givol D., et al. // Nature. 1986. V. 320. P. 84–86.
- Jablonski M.M., Tombran-Tink J., Mrazek D.A., Iannaccone A. // J. Neurosci. 2000. V. 20. P. 7149–7157.
- Crawford S.E., Stellmach V., Huang X., et al. // Cell Sci. 2001. V. 114. P. 4421–4428.
- Cheung L.W.T., Au S.C.L., Cheung A.N.Y., et al. // Endocrinology. 2006. V. 147. P. 4179–4191.
- Houenou L.J., D'Costa A.P., Linxi L., et al. // J. Comp. Neurol. 1999. V. 412. P. 506–514.
- Jablonski M.M., Tombran-Tink J., Mrazek D.A., Iannaccone A. // Glia. 2001. V. 35. P. 14–25.
- Sugita Y., Becerra S.P., Chader G.J., Schwartz J.P. // J. Neurosci. Res. 1997. V. 49. P. 710–718.
- Brodeur G.M. // New Engl. J. Med. 1996. V. 334. P. 1537–1539.
- Phillips N.J., Ziegler M., Radford D.M., et al. // Cancer Res. 1996. V. 56. P. 606–611.
- Malchiodi-Albedi F., Feher J., Caiazza S., et al. // Int. J. Dev. Neurosci. 1998. V. 16. P. 423–432.
- Guillery R.W. // Trends Neurosci. 1986. V. 9. P. 364–367.
- Abul-Hassan K., Walmsley R., Tombran-Tink J., Boulton M. // Pigment Cell Res. 2000. V. 13. P. 436–441.
- Cao W., Tombran-Tink J., Chen W., et al. // J. Neurosci. Res. 1999. V. 57. P. 789–800.
- Ho T.C., Yang Y.C., Cheng H.C., et al. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 2006. V. 342. P. 372–378.
- Taniwaki T., Becerra S.P., Chader G.J., Schwartz J.P. // J. Neurochem. 1995. V. 64. P. 2509–2517.
- Araki T., Taniwaki T., Becerra S.P., et al. // J. Neurosci. Res. 1998. V. 53. P. 7–15.
- Taniwaki T., Hirashima N., Becerra S.P., et al. // J. Neurochem. 1997. V. 68. P. 26–32.
- DeCoster M.A., Schabelman E., Tombran-Tink J., Bazan N.G. // J. Neurosci. Res. 1999. V. 56. P. 604–610.
- Bilak M.M., Corse A.M., Bilak S.R., et al. // J. Neuropathol. Exp. Neurol. 1999. V. 58. P. 719–728.
- Yabe T., Wilson D., Schwartz J.P. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 43313–43319.
- Dawson D.W., Volpert O.V., Gillis P., et al. // Science. 1999. V. 285. P. 245–248.
- Ferrara N., Davis-Smyth T. // Endocr. Rev. 1997. V. 18. P. 4–25.
- Klagsbrun M., Vlodavsky I. // Prog. Clin. and Biol. Res. 1988. V. 266. P. 55–61.

54. O'Reilly M.S., Holmgren L., Shing Y., et al. // *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 1994. V. 59. P. 471–482.
55. DiPietro L.A., Nebgen D.R., Polverini P.J. // *J. Vasc. Res.* 1994. V. 31. P. 178–185.
56. Smith L.E., Wesolowski E., McLellan A., et al. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1994. V. 35. P. 101–111.
57. Stellmach V., Crawford S., Zhou W., Bouck N. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. P. 2593–2597.
58. Bouck N. // *Trends Mol. Med.* 2002. V. 8. P. 330–334.
59. Volpert O.V., Zaichuk T., Zhou W., et al. // *Nat. Med.* 2002. V. 8. P. 349–357.
60. Gerber H.P., Dixit V., Ferrara N. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 13313–13316.
61. Aoudjit F., Vuori K. // *J. Cell. Biol.* 2001. V. 152. P. 633–644.
62. Barreiro R., Schadlu R., Herndon J., et al. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2003. V. 44. P. 1282–1286.
63. Mori K., Duh E., Gehlbach P., et al. // *J. Cell Physiol.* 2001. V. 188. P. 253–263.
64. Chen L., Zhang S., Barnstable C.J., Tombran-Tink J. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 2006. V. 348. P. 1288–1295.
65. Mayo L.D., Kessler K.M., Pincheira R., et al. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 25184–25189.
66. Read M.A., Whitley M.Z., Gupta S., et al. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 2753–2761.
67. Rousseau S., Houle F., Landry J., Huot J. // *Oncogene.* 1997. V. 15. P. 2169–2177.
68. Hutchings H., Maitre-Boube M., Tombran-Tink J., Plouët J. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 2002. V. 294. P. 764–769.
69. Wu Y.Q., Notario V., Chader G.J., Becerra S.P. // *Protein Expr. Purif.* 1995. V. 6. P. 447–456.
70. Alberdi E., Aymerich M.S., Becerra S.P. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 31605–31612.
71. Aymerich M.S., Alberdi E.M., Martinez A., Becerra S.P. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2001. V. 42. P. 3287–3293.
72. Notari L., Baladron V., Aroca-Aguilar J.D., et al. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. P. 38022–38037.
73. Gettins P.G., Simonovic M., Volz K. // *Biol. Chem.* 2002. V. 383. P. 1677–1682.
74. Goetzl E.J., Tigyi G. J. // *Cell. Biochem.* 2004. V. 92. P. 867–868.
75. Balsinde J., Winstead M.V., Dennis E.A. // *FEBS Lett.* 2002. V. 531. P. 2–6.
76. SanGiovanni J.P., Chew E.Y. // *Prog. Retin. Eye Res.* 2005. V. 24. P. 87–138.
77. Kim H.Y., Akbar M., Kim K.Y. // *J. Mol. Neurosci.* 2001. V. 16. P. 279–284.
78. Rose D.P., Connolly J.M. // *Pharmacol. Ther.* 1999. V. 83. P. 217–244.
79. Rose D.P., Connolly J.M. // *Int. J. Oncol.* 1999. V. 15. P. 1011–1015.
80. Jenkins C.M., Mancuso D.J., Yan W., et al. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 48968–48975.
81. Bazan N.G., Marcheselli V.L., Hu J., et al. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2005. V. 46. P. 167.
82. Marcheselli V.L., Bazan N.G., Hu J., et al. Program 148.9. Washington, D.C.: Society for Neuroscience, 2005.
83. Notari L., Miller A., Martinez A., et al. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2005. V. 46. P. 2736–2747.

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

УДК 577.21, 575.224.22, 616.711-002

Ассоциация аллельного варианта гена аминокептидазы ERAP1 с риском развития анкилозирующего спондилита

И. В. Звягин^{1*#}, В. Ю. Дородных^{1#}, И. З. Мамедов¹, Д. Б. Староверов¹, А. Г. Бочкова²,
Д. В. Ребриков^{3,4}, Ю. Б. Лебедев¹

¹ Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

² Институт ревматологии РАМН, Москва

³ Учреждение Российской академии наук Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва

⁴ ООО «ДНК-Технология», Москва

Авторы внесли равный вклад в данную работу.

*E-mail: izvyagin@gmail.com

Поступила в редакцию 03.09.2010 г.

РЕФЕРАТ Анкилозирующий спондилит – аутоиммунное заболевание, в развитие которого вовлечен целый ряд генов, продукты которых выполняют различные функции в системе иммунитета. С повышенным риском развития анкилозирующего спондилита ассоциирован ряд несинонимичных однонуклеотидных полиморфизмов в кодирующей части гена аминокептидазы ERAP1. Мы провели анализ представленности аллельных вариантов гена *erap1* по пяти несинонимичным однонуклеотидным полиморфизмам, связанным с риском развития заболевания среди представителей европеоидной расы. С помощью аллель-специфической ПЦР определены генотипы 84 больных и 77 здоровых доноров из российской популяции, положительных по аллельному варианту *hla-B*27*. Мы установили статистически достоверные отличия представленности аллельных вариантов по трем из пяти маркеров среди больных по сравнению с контрольной группой. По результатам генотипирования восстановлены теоретические гаплотипы по трем маркерам гена *erap1* и найдены два гаплотипа, представленность которых достоверно различается между выборками. Один из этих гаплотипов определен как предположительно рискованный, второй – как предположительно протективный. С использованием образцов кДНК и аллель-специфических пар праймеров восстановлены фактические гаплотипы в выборке больных. Показано соответствие теоретически рассчитанных частот гаплотипов и определенных экспериментально. Частота рискованного гаплотипа ССТ (rs17482078/10050860/2287987) в группе больных составила 88%, что полностью соответствовало результатам EM-реконструкции.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА аминокептидаза ERAP1, однонуклеотидный полиморфизм, аллель-специфическая ПЦР, гаплотип, анкилозирующий спондилит.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АС – анкилозирующий спондилит; ЭПР – эндоплазматический ретикулум; МНС – главный комплекс гистосовместимости; ФНО, РФНО – фактор некроза опухоли, рецептор фактора некроза опухоли; ИЛ – интерлейкин.

ВВЕДЕНИЕ

Анкилозирующий спондилит (АС) – аутоиммунное заболевание, относящееся к группе спондилоартропатий, для которого характерно развитие воспаления суставов осевого скелета с последующим формированием участков окостенения. Признаки заболевания появляются в основном в возрасте 20–25 лет и медленно прогрессируют в течение всей жизни. К настоящему времени выявлен ряд ассоциаций риска развития заболевания с несколькими геномными ло-

кусами, продукты которых действуют на разных стадиях иммунного ответа. По результатам близнецовых исследований у монозиготных близнецов конкордантность варьирует от 26 до 60%, в то время как у дизиготных – от 4 до 20%, что демонстрирует важность генетического окружения для развития АС [1–3].

Наиболее строгая ассоциация с развитием заболевания выявлена для аллельного варианта *hla-B*27* гена МНС типа I. Среди больных АС представителей европеоидной расы около 90% – носители дан-

ного аллеля, однако заболевание развивается только у 5% носителей *hla-B*27* [4]. В результате крупномасштабных полногеномных исследований, проведенных на больших выборках больных и здоровых доноров, обнаружены ассоциации однонуклеотидных замен в нескольких геномных локусах, не относящихся к МНС-I. Для этих локусов характерна менее строгая ассоциация с риском развития АС. Среди неМНС-локусов наиболее сильная ассоциация показана для гена аминоксептидазы *erap1* [5, 6].

Аминоксептидаза ERAP1 принимает участие в ряде процессов в ходе иммунного ответа. Различия в функциональной роли белка связаны, вероятно, с тем или иным месторасположением ERAP1. Так, основным местом локализации ERAP1 в клетках человека и мыши признан эндоплазматический ретикулум (ЭПР), вместе с тем, в ряде клеток человека существуют формы белка, связанные с внешней поверхностью цитоплазматической мембраны либо секреторируемые в межклеточное пространство [7]. Одной из функций ERAP1 является N-концевой протеолиз пептидов, образующихся в ходе деградации клеточных белков с участием протеасомы, для презентации их в контексте молекул МНС-I. Кроме того, ERAP1 связана с образованием растворимой формы рецептора типа 1 фактора некроза опухоли (РФНО-1) и растворимых форм рецепторов интерлейкинов (ИЛ) 1 и 6, играя важную роль в регуляции иммунного ответа [8–10].

Проведенные к настоящему времени исследования на выборках различной этнической принадлежности и степени генетической однородности по *hla-b*-локусу выявили в кодирующей части гена *erap1* ряд несинонимичных однонуклеотидных полиморфизмов, ассоциированных с повышенным риском развития АС [11–15]. При этом набор ассоциированных с АС полиморфизмов в этих работах различается, что, вероятно, связано с генетическими особенностями исследованных выборок.

Наличие аминоксептидных замен и их сочетаний, обусловленных несинонимичными заменами, возможно, приводит к образованию вариантов аминоксептидазы с различной активностью, а также к нарушению процессинга презентуемых пептидов или регуляции активности клеток иммунной системы посредством ФНО или ИЛ-1 и -6. Предполагаемая роль ERAP1 в развитии АС может заключаться в презентации молекулами МНС-I неправильных пептидов вследствие нарушения функций протеиназы, что может приводить к распознаванию представленных пептидов как чужеродных, а также к повышению уровня свободных молекул МНС-I или гомодимеров, состоящих только из тяжелых цепей на поверхности клетки. В результате возможно развитие неспецифических иммунных реакций против клеток, продуцирующих

неправильно свернутые белки [16]. Нарушение активности аминоксептидазы в отношении рецепторов к ИЛ также может объяснять вклад мутантных вариантов ERAP1 в развитие АС.

В нашей работе мы определили частоты встречаемости аллельных вариантов гена *erap1* и соответствующих генотипов по пяти молекулярно-генетическим маркерам, представляющим собой однонуклеотидные несинонимичные замены в кодирующей части гена у больных АС и у здоровых доноров из российской популяции. Все больные и все члены контрольной группы были положительными по аллелю *hla-B*27*. Для генотипирования были выбраны маркеры rs2287987 (Met349Val), rs30187 (Lys528Arg), rs10050860 (Asp575Asn), rs17482078 (Arg725Gln) и rs27044 (Glu730Gln), ассоциированные с АС по данным разных авторов [11–15]. Расположение указанных несинонимичных замен в кодирующей части гена *erap1* позволяет предполагать функциональную значимость соответствующих аминоксептидных замен.

Результаты определения генотипов были использованы для построения расчетных гаплотипов по указанным маркерам и последующего анализа ассоциации аллельных вариантов *erap1* с риском развития АС.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Образцы геномной ДНК и РНК

В работе использованы образцы геномной ДНК, полученные из периферической крови 77 *hla-B*27*-положительных здоровых доноров в возрасте от 21 до 63 лет и 84 *hla-B*27*-положительных больных с аксиальной формой АС. Геномную ДНК выделяли из лейкоцитарной фракции крови с помощью набора реактивов Diatom Prep 100 (Лаборатория Изоген, Москва) в соответствии с инструкцией производителя.

Образцы суммарной РНК больных выделяли из лейкоцитарной фракции периферической крови с помощью реактива «TRIzol» (Invitrogen Lifetechnologies, США) в соответствии со стандартным протоколом производителя.

Синтез первых цепей кДНК

Синтез первых цепей кДНК проводили, используя 1–2 мкг суммарной РНК с помощью набора для синтеза первых цепей кДНК «Mint» (Евроген, Россия), в соответствии с протоколом производителя.

Определение гено- и гаплотипов

Генотипирование проводили методом аллель-специфической ПЦР с использованием сочетания пар праймеров, соответствующего определяемому молекулярно-генетическому маркеру (табл. 1):

Таблица 1. Структура праймеров, использованных в работе

Праймер	Нуклеотидная последовательность (5'–3')
30-A For	ATGAACACTTGGACACTGCACAA
30-G For	ATGAACACTTGGACACTGCACAG
27-C Rev	CACACAGGCGAGGAGTAGTAGATC
27-G Rev	CACACAGGCGAGGAGTAGTAGATG
100-G For	CATTCATCACCAGCAAATGCG
100-A For	CATTCATCACCAGCAAATGCA
174-T Rev	TAGTAGTTSACTCCGCAGCAATT
174-C Rev	TAGTAGTTSACTCCGCAGCAATC
228-A For	ATCAAGTAAGCTTGGCATCAGAA
228-G For	ATCAAGTAAGCTTGGCATCAGAG
228 int	AACAAATTAACCTCAAATGTGAAG
30 int	CCTCCTTAATCCTACTGGGAAGAT
100 int	GGCCATACATATGATATAACCCAGTA
174&27 int	CTGGGACTCTTCATGGTACTTGAG

аллель-специфический праймер к определяемому маркеру совместно с праймером, специфичным к ближайшему интрону. Генотип определяли по наличию или отсутствию продукта ПЦР соответствующей длины. Для определения гаплотипов использовали аллель-специфическую ПЦР с кДНК в качестве матрицы, прямой и обратный аллель-специфические праймеры к соответствующей паре маркеров.

Для повышения дискриминирующей способности в каждый из аллель-специфических праймеров был введен некомплементарный матрице нуклеотид в положение -3. Достоверность результатов подтверждали независимым повторением гено- и гаплотипирования, а также непротиворечивостью результатов определения гено- и гаплотипов.

Реакцию ПЦР проводили в объеме 15 мкл при температуре отжига праймеров 65°C с использованием набора HS Taq-ДНК-полимераза (Евроген, Россия) в течение 30 и 33 циклов для генотипирования и гаплотипирования соответственно.

Статистическая обработка результатов

Для статистической обработки результатов использовали программы: Haploview 4.1 (<http://www.broadinstitute.org/haploview/haploview>) и Genetic Data Analysis (Lewis, P. O., and Zaykin, D. 2001. Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>).

Соответствие частот генотипов равновесному распределению по закону Харди–Вайнберга оценивали с помощью точного критерия, описанного в работе G. Abecasis и J. Wigginton [17], а также с помощью точного критерия Фишера.

Значимость различий частот встречаемости аллельных вариантов по отдельным молекулярно-генетическим маркерам и теоретических значений встречаемости определенных гаплотипов определяли с помощью стандартного критерия χ^2 с учетом поправки Йейтса. Величину фактора риска (OR) и доверительный интервал (CI95%) рассчитывали с помощью on-line-калькулятора (www.openepi.com).

Для определения неравновесного сцепления между маркерами и расчета теоретических частот встречаемости гаплотипов использовали алгоритм, предлагаемый программой Haploview 4.1 (EM – Expectation-maximization algorithm). Строгое неравновесное сцепление определяли как $D' \geq 0.8$, CI95% 0.7–0.99 [18].

Результаты определения теоретических частот встречаемости гаплотипов были подтверждены с использованием байесовского алгоритма программы PHASE 2.1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Частота встречаемости минорных аллельных вариантов гена *erap1* по трем маркерам снижена у больных АС

Используя набор аллель-специфических праймеров (табл. 1, рис. 1), мы определили частоты встречаемости 10 аллельных вариантов гена *erap1* и соот-

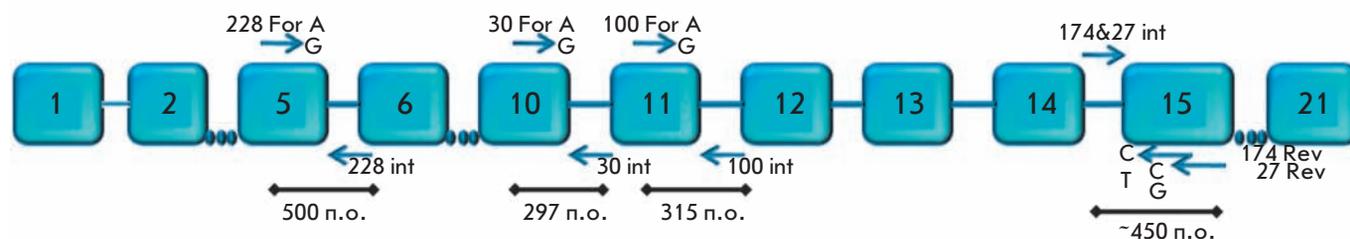


Рис. 1. Схема расположения праймеров для определения аллельных вариантов гена *erap1*. Показаны: экзоны и интроны гена *erap1*, номера экзонов, названия праймеров, длины получаемых продуктов ПЦР в п.о.

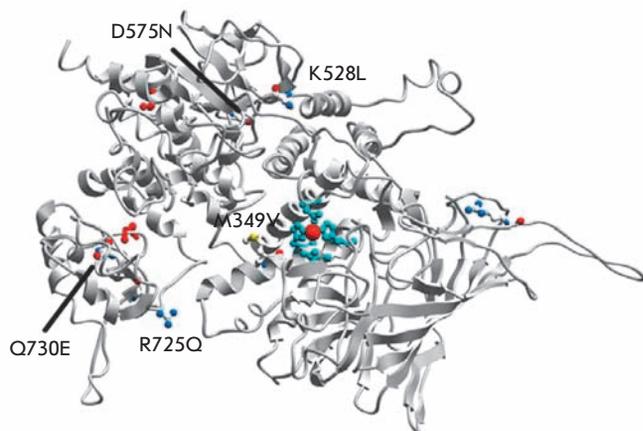


Рис. 2. Предполагаемая трехмерная структура белка ERAP1, смоделированная на основе структурной гомологии (по [11] с изменениями). Указаны положения аминокислотных замен, связанных с маркерами, по которым в настоящей работе определяли аллельные варианты гена *erap1* (синие сферы). Активный центр молекулы вокруг атома Zn (красный шарик) выделен голубым цветом.

ветствующих генотипов в выборке из 84 больных АС и в контрольной группе из 77 здоровых доноров, положительных по аллельному варианту *hla-B27*. Аллельные варианты гена *erap1* содержали различные молекулярно-генетические маркеры: rs2287987 (C/T, Met349Val), rs30187 (C/T, Lys528Arg), rs10050860 (C/T, Asp575Asn), rs17482078 (C/T, Arg725Gln) и rs27044 (C/G, Glu730Gln) – несинонимичные однонуклеотидные замены в кодирующей части гена, приводящие к возникновению аминокислотных замен в молекуле белка. Несинонимичные замены в кодирующей части гена *erap1* могут приводить к образованию функционально различных продуктов, способных, возможно, влиять на развитие аутоиммунной патологии или оказывать протективный эффект. Каждый из пары аллельных вариантов, определяемых по соответствующему маркеру, как показано ранее другими авторами [11–15], ассоциирован с повышенным риском развития АС. Два из пяти исследуемых маркеров “расположены” вблизи предполагаемых активных центров аминоксептидазы: rs2287987 – вблизи центра связывания иона Zn^{2+} [11], rs30187 – вблизи предполагаемого субстратсвязывающего кармана [19] (рис. 2).

В обеих выборках распределение генотипов по каждой паре аллельных вариантов всех пяти полиморфизмов не отклонялось значимо от равновесного распределения частот генотипов в популяции согласно закону Харди–Вайнберга.

Анализ результатов генотипирования показал, что частота встречаемости минорных аллельных вариантов гена по трем из пяти маркеров: rs2287987 ($p < 0.002$, OR = 0.35), rs10050860 ($p < 0.004$, OR = 0.39) и rs17482078 ($p < 0.05$, OR = 0.52), значимо снижена среди больных АС в российской популяции по сравнению со здоровыми донорами (табл. 2). По результатам ассоциативного анализа три аллельных варианта гена *erap1* статистически достоверно ассоциированы с повышенным риском развития АС: rs2287987 [T] (OR = 2.86), rs10050860 [C] (OR = 2.54) и rs17482078 [C] (OR = 1.91). В то же время наши результаты демонстрируют отсутствие достоверной ассоциации аллельных вариантов по полиморфизмам rs30187 и rs27044 с АС в российской популяции.

Снижение частоты встречаемости минорных аллелей по маркерам rs2287987, rs10050860 и rs17482078 сопровождается снижением количества гетерозигот по минорному аллелю и возрастанием количества гомозигот по противоположному варианту гена в группе больных по сравнению с контрольной группой. Гетерозиготность по маркерам rs30187 и rs27044, не ассоциированным с АС в российской популяции, наоборот, возрастает у больных, однако частота минорного аллельного варианта при этом меняется незначительно.

Полученные нами результаты в основном согласуются с результатами других исследователей. В ряде работ установлена ассоциация всех пяти использованных нами маркеров с риском развития АС [5, 6, 11], однако выборки больных и здоровых доноров в этих работах содержали значительную долю *hla-B27*-отрицательных доноров. В двух других исследованиях, выполненных на выборках, полностью или на 77–85% положительных по *hla-B27* [14, 15], показано отсутствие ассоциации с риском развития АС аллельных вариантов по маркерам rs30187 и rs17482078 и наличие ассоциации с маркерами rs2287987, rs10050860 и rs27044 в первом случае. Во второй работе с риском развития АС были ассоциированы аллельные варианты по маркерам rs10050860 и rs30187, но не rs27044.

В корейской популяции ассоциации с АС выявлены только для маркеров rs27044 и rs30187, тогда как частоты встречаемости аллельных вариантов по маркерам rs2287987, rs10050860 и rs17482078 не отличались достоверно в выборке больных и в контрольной группе [12].

Различия в результатах ассоциативного анализа, полученных разными группами, вероятно, связаны со значительными отличиями частот встречаемости рассматриваемых аллелей *erap1* в исследованных популяциях. Другой причиной несоответствия выводов процитированных работ может быть генетическая

Таблица 2. Частоты встречаемости аллельных вариантов и генотипов по исследуемым генетическим маркерам среди двух выборок

Маркер [полиморфный нуклеотид]	Больные АС, <i>n</i> = 84		Здоровые доноры, <i>n</i> = 77		p	OR (95%CI)		
	MAF* [нуклеотид минор- ного аллеля]	Число геноти- пов (частота)	MAF* [нуклеотид минор- ного аллеля]	Число генотипов (частота)				
rs2287987 [C/T]	0.09 [C]	CC	1 (0.01)	0.22 [C]	CC	3 (0.04)	0.002	0.35 (0.18–0.68)
		CT	13 (0.15)		CT	26 (0.36)		
		TT	70 (0.84)		TT	44 (0.60)		
rs30187 [C/T]	0.37 [T]	CC	29 (0.35)	0.33 [T]	CC	35 (0.45)	0.55	1.18 (0.75–1.87)
		CT	48 (0.57)		CT	33 (0.43)		
		TT	7 (0.08)		TT	9 (0.12)		
rs10050860 [C/T]	0.11 [T]	CC	66 (0.78)	0.23 [T]	CC	46 (0.60)	0.004	0.39 (0.21–0.73)
		CT	18 (0.21)		CT	26 (0.34)		
		TT	-		TT	5 (0.06)		
rs17482078 [C/T]	0.13 [T]	CC	65 (0.77)	0.21 [T]	CC	47 (0.61)	0.046	0.52 (0.29–0.95)
		CT	17 (0.20)		CT	27 (0.35)		
		TT	2 (0.02)		TT	3 (0.04)		
rs27044 [C/G]	0.33 [G]	GG	7 (0.08)	0.29 [G]	GG	9 (0.12)	0.47	1.23 (0.76–1.97)
		GC	42 (0.5)		GC	26 (0.34)		
		CC	35 (0.42)		CC	42 (0.55)		

*MAF – частота минорного аллельного варианта.

разнородность по локусу *hla-B27* анализируемых авторами парных выборок больных АС и здоровых доноров. В нашей работе при формировании выборок мы особое внимание уделяли их генетической однородности по локусу *hla-B27* и однотипности клинических проявлений заболевания, что существенно снижало риск низкой достоверности выявляемых ассоциаций.

Определение теоретической частоты встречаемости гаплотипов на основе результатов генотипирования

По результатам генотипирования двух выборок была определена теоретическая частота встречаемости гаплотипов по исследуемым маркерам и проведен поиск гаплотипов, частота встречаемости которых достоверно повышена среди больных АС и, возможно, связанных с риском развития АС. С этой целью с использованием программы Haploview 4.1 была определена степень неравновесного сцепления (linkage disequilibrium) между парами аллельных вариантов по исследуемым маркерам. Полиморфизмы rs2287987, rs10050860 и rs17482078 находились в статистически достоверном попарном строгом неравновесном сцеплении ($D' \geq 0.85$, 95%CI 0.76–0.99, по [18]) и были объединены в блок. Для маркеров в блоке были рассчитаны теоретические частоты встречаемости гап-

типов в выборках больных АС и здоровых индивидов. Из дальнейшего анализа были исключены гаплотипы с расчетной частотой встречаемости менее 5%.

Гаплотип ССТ, по результатам анализа расчетных частот встречаемости гаплотипов, статистически достоверно ассоциирован с риском развития АС ($p < 0.03$, OR 1.96), в то время как расчетная частота гаплотипа ТТС достоверно ниже в выборке больных по сравнению с выборкой здоровых доноров ($p < 0.003$, OR 0.33) (табл. 3).

Определение фактических частот встречаемости гаплотипов *erap1* в выборке больных АС из российской популяции

С использованием попарных комбинаций аллель-специфических праймеров к исследуемым маркерам и образцов кДНК той же выборки больных определены фактические частоты встречаемости гаплотипов по пяти молекулярно-генетическим маркерам гена *erap1*. В табл. 4 представлено распределение частот встречаемости фактических гаплотипов в выборке больных по всем пяти маркерам, а также по тем трем из них, для которых нами показана статистически достоверная связь с риском развития АС при анализе отдельных маркеров. В таблице не приведены гаплотипы, встречаемость которых составила менее

Таблица 3. Расчетные частоты встречаемости гаплотипов по маркерам rs17482078/10050860/2287987, ассоциированным с риском развития АС в российской популяции

Гаплотип	Частота встречаемости среди больных АС, n = 84	Частота встречаемости среди здоровых доноров, n = 77	P	OR (95%CI)
ССТ	0.86	0.75	0.026	1.96 (1.12–3.46)
ТТС	0.08	0.2	0.003	0.33 (0.17–0.67)

Таблица 4. Распределение фактических гаплотипов в выборке больных АС российской популяции

Гаплотип*	Количество гаплотипов среди больных АС (частота встречаемости), n = 69
rs27044/17482078/10050860/30187/2287987	
ССССТ	70 (0.51)
ГССТТ	36 (0.26)
GCCCT	8 (0.06)
СССТТ	7 (0.05)
GTTGT	7 (0.05)
СТТС	2 (0.01)
rs17482078/10050860/2287987	
ССТ	121 (0.88)
ТТТ	7 (0.05)
ТТС	2 (0.01)

*Подчеркнуты и выделены жирным нуклеотиды, входящие в состав теоретически определенных рискового и протективного гаплотипов.

5%, за исключением гаплотипа ТТС, определенного как предположительно протективный на основе теоретических расчетов.

Фактическая частота встречаемости предположительно рискового гаплотипа ССТ среди больных АС составляет около 88%, что хорошо согласуется с теоретически рассчитанной частотой. Фактическая частота встречаемости предположительно протективного гаплотипа ТТС составляет около 1%, тогда

как теоретически рассчитанная величина равна примерно 8% (табл. 3). Эти различия, возможно, связаны с недостаточным для достоверного определения фактической частоты встречаемости протективного гаплотипа размером выборки больных АС.

Описанный в нашей работе аллельный вариант гена *erap1*, ассоциированный с повышенным риском развития АС, совпадает в большинстве позиций с вариантами, обнаруженными ранее на выборках больных и здоровых представителей европейских популяций (табл. 5).

Однако в настоящее время имеются противоречивые данные о рисковом гаплотипе по маркерам rs27044 и rs30187 в различных популяциях. Так, в работе Maksymowuch и соавт. [14] выявлена ассоциация С-аллеля (маркер rs27044) с риском развития АС, тогда как в работе Pazar и соавт. [15] показано, что G-аллель по тому же маркеру характерен для обоих выявленных рисковом гаплотипов. Причем два рисковом гаплотипа, описанных в данной работе [15], инвариантны по маркеру rs30187. Эти результаты, а также противоречивость данных об ассоциации аллельных вариантов гена *erap1* по маркерам rs27044 и rs30187 с риском развития АС, возможно, означают, что кодируемые данными полиморфизмами аминокислотные замены не влияют на активность аминопептидазы и ее участие в развитии АС. Описанные ассоциации могут быть вызваны как неоднородным составом выборок больных, так и генетической сцепленностью этих полиморфизмов с другими несино-

Таблица 5. Аллельные варианты *erap1*, ассоциированные с повышенным риском развития анкилозирующего спондилита в различных популяциях

rs27044	rs17482078	rs10050860	rs30187	rs2287987	Ссылка
C	-	C	T	-	[14]
G	C	C	T	T	[15]
G	C	C	C	T	[15]
G	C	C	T	-	[12]
G	-	-	T	-	[13]
-	C	C	-	T	Настоящая работа

нимичными заменами, определяющими изменение функциональных свойств аминопептидазы, которые могут быть существенны для развития АС.

Опубликованные результаты немногочисленных исследований *in vitro* свидетельствуют о значительном влиянии на активность аминопептидазы ERAP1 замены Lys528Arg, которая кодируется полиморфизмом rs30187. Goto и соавт. [19] показали, что вариант ERAP1, содержащий Arg в положении 528, имеет сниженную пептидазную активность по отношению к синтетическим субстратам и к природным гормонам – ангиотензину II и каллидину. В этой же работе [19] показано, что замена Gln730Glu, кодируемая полиморфизмом rs27044, и замена Asp575Asn, кодируемая полиморфизмом rs10050860, практически не влияют на активность пептидазы по отношению к синтетическим и природным субстратам. При транзientной экспрессии *erap1* в линии клеток меланомы показано, что аминокислотная замена Met349Val (полиморфизм rs2287987) увеличивает пептидазную активность ERAP1 в отношении синтетического субстрата [20]. Сопоставление аминокислотных замен, охарактеризованных в процитированных выше работах, с результатами ассоциативного анализа, проведенного как в нашей работе, так и другими авторами (табл. 5), позволяет предполагать, что некоторые из ассоциированных с АС несинонимичных замен способны изменять пептидазную активность ERAP1. Вместе с тем большая часть строго ассоциированных с заболеванием аллелей, вероятно, имеет иные функциональные проявления, поскольку соответствующие аминокислотные замены не влияют на активность белка в отношении синтетических субстратов.

Мнимые несоответствия результатов функциональных тестов и ассоциативного анализа могут быть

преодолены при определении гаплотипов, характеризующих выборки больных и здоровых. В нашей работе мы выявили рисковый ССТ- и протективный ТТС-гаплотипы по маркерам rs17482078/10050860/2287987. Представленность каждого из гаплотипов достоверно повышена в соответствующей выборке (табл. 4). Одна из кодируемых протективным гаплотипом замен – Met349Val – приводит к увеличению активности ERAP1 в отношении некоторых субстратов [20]. Поэтому можно предположить, что повышение пептидазной активности ERAP1 защищает от развития АС. Протективный эффект гаплотипа ТТС может быть связан с активностью ERAP1 в отношении рецепторов провоспалительных цитокинов или обеспечением правильной презентации пептидов на молекулах МНС-I. Напротив, несинонимичные замены рискового гаплотипа ССТ приводят, возможно, к повышению уровня мембраносвязанных форм РФНО-1, рецепторов ИЛ-6 и ИЛ-1.

Принимая во внимание, что АС относится к мультигенным заболеваниям, в дальнейшем, изучая роль ERAP1 в развитии АС, необходимо как определять функции аллельных вариантов гена, так и учитывать предполагаемое взаимодействие белка с продуктами других генов, ассоциированных с заболеванием. В реализации подобных взаимодействий, возможно, состоит функциональная роль несинонимичных замен в рисковом гаплотипе гена *erap1*, выявленном нами для популяции Центральной России. ●

Работа выполнена при поддержке гранта программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и грантов Российского фонда фундаментальных исследований (№ 10-04-01771-а и 11-04-01585-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- van der Linden S.M., Valkenburg H.A., de Jongh B.M., Cats A. // *Arthritis Rheum.* 1984. V. 27. № 3. P. 241–249.
- Pedersen O.B., Svedensen A.J., Ejstrup L., et al. // *Scand. J. Rheumatol.* 2008. V. 37. № 2. P. 120–126.
- Brown M.A., Laval S.H., Brophy S., Calin A. // *Ann. Rheum. Dis.* 2000. V. 59. № 11. P. 883–886.
- Reveille J.D., Maganti R.A. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2009. V. 649. P. 159–176.
- The Australo-Anglo-American Spondyloarthritis Consortium (TASC) // *Nature Genetics.* 2010. V. 42. № 2. P. 123–127.
- Wellcome Trust Case Control Consortium & The Australo-Anglo-American Spondylitis Consortium (TASC) // *Nature Genetics.* 2007. V. 39. № 11. P. 1329–1337.
- Toshihiro T., Hattori A., Shinako M., et al. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 34. P. 32275–32283.
- Cui X., Hawari F., Alsaaty S., et al. // *J. Clin. Invest.* 2002. V. 110. № 4. P. 515–526.
- Cui X., Rouhani N.F., Hawari F., et al. // *J. Immunology.* 2003. V. 171. № 12. P. 6814–6819.
- Cui X., Rouhani N.F., Hawari F., Levine J.S. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 28677–28685.
- Harvey D., Pointon J.J., Evans M.D., et al. // *Hum. Mol. Genet.* 2009. V. 18. № 21. P. 4204–4212.
- Choi C.-B., Kim T.-H., Jun J.-B., et al. // *Ann. Rheum. Dis.* 2010. V. 69. № 3. P. 582–584.
- Tsui F.W.L., Haroon N., Reveille D.J., et al. // *Ann. Rheum. Dis.* 2010. V. 69. № 4. P. 733–736.
- Maksymowych W.P., Inman R.D., Gladman D.D., et al. // *Arthr. & Rheum.* 2009. V. 60. № 5. P. 1317–1323.
- Pazar B., Safrani E., Gergely P., et al. // *J. Rheum.* 2010. V. 37. № 2. P. 379–384.
- Haroon N., Inman D.R. // *Nat. Rev. Rheum.* 2010. *Advanced online publication.*
- Wigginton J., Cutler D., Abecasis G.A. // *Am. J. Hum. Genet.* 2005. V. 76. № 5. P. 887–883.
- Gabriel S.B., Schaffner S.F., Nguyen H., et al. // *Science.* 2002. V. 296. № 5576. P. 2225–2229.
- Goto Y., Hattori A., Ishii Y., Tsujimoto M. // *FEBS Lett.* 2006. V. 580. P. 1833–1838.
- Kamphausen E., Kellert C., Abbas T., et al. // *Cancer Immun. Immunother.* 2010. V. 59. № 8. P. 1273–1284.

УДК 577.29

Адаптивные изменения профиля экспрессии генов *Mycobacterium avium* при заражении мышей, генетически чувствительных и резистентных к инфекции

Д. В. Игнатов¹, Т. А. Скворцов¹, К. Б. Майоров², А. С. Апт², Т. Л. Ажикина^{1*}¹Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10²Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза РАМН, 107564, Москва, Яузская аллея, 2

*E-mail: tatazhik@ibch.ru

Поступила в редакцию 03.08.2010 г.

РЕФЕРАТ Проведено исследование транскриптомов *Mycobacterium avium* (штамм 724R) при инфекции мышей различных линий – генетически чувствительных и резистентных к этим бактериям. Определен набор генов *M. avium*, транскрибирующихся в легочной ткани мышей сравниваемых линий, и выявлены дифференциально транскрибирующиеся гены. Продемонстрировано, что при развитии инфекции в генетически восприимчивом организме повышена экспрессия ряда генов, отвечающих за восстановление NO, осуществление цикла Кребса и окислительного фосфорилирования, биосинтез жирных кислот, модификацию генома, репликацию и трансляцию. При развитии инфекции в резистентном организме повышена экспрессия ряда генов, отвечающих за изменение свойств клеточной поверхности, переход к анаэробному нитратному дыханию, деградацию жирных кислот, синтез полициклических производных жирных кислот, биосинтез микобактина и других поликетидов. По-видимому, при персистенции *M. avium* в резистентном организме наблюдается переход к хроническому состоянию, которое вызвано дефицитом двухвалентных ионов металлов и характеризуется переходом к анаэробному типу дыхания, получением энергии за счет деградации жирных кислот и изменением свойств клеточной стенки.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА *Mycobacterium avium*, анализ транскриптома *in vivo*, клонирование идентичных последовательностей (coincidence cloning), RNA-seq.

ВВЕДЕНИЕ

Инфекционные заболевания, вызываемые внутриклеточными патогенными бактериями, – одна из важных проблем современного мирового здравоохранения. Развитие инфекционного процесса зависит не только от защитных механизмов (природный и приобретенный иммунный ответ, барьерные функции слизистых), но и от специфической экспрессии бактериальных генов. Изменения в экспрессии, возникающие в ответ на защитную реакцию организма-хозяина, являются необходимым условием для выживания и функционирования патогенных бактерий. Анализ этих изменений необходим для понимания патогенеза инфекционного заболевания и выработки подходов к наиболее эффективному лечению.

Mycobacterium avium – это широко распространенные в окружающей среде микобактерии, которые

становятся внутриклеточными патогенами человека в отсутствие нормального Т-клеточного иммунитета [1, 2]. Они выявляются приблизительно у 70% пациентов со сформировавшимся неизлечимым СПИДом и считаются главной причиной смерти таких больных [3]. На фоне частично ослабленного иммунитета, например у пожилых людей и детей, *M. avium* может вызывать хронические заболевания легких [4–6]. При моделировании инфекции на мышах линии C57BL/6 (B6) и производных от нее линий, несущих нокаут-мутации существенных для иммунитета генов, было показано, что Т-клеточный иммунный ответ на *M. avium* играет как защитную, так и патогенетическую роль. Баланс между защитным иммунным ответом и патологическими процессами в легочной ткани при этой инфекции во многом напоминает патогенез туберкулеза [7–9], поэтому можно пред-

положить, что в основе заболеваний, вызываемых этими микобактериями, лежат не только сходные защитные механизмы иммунной системы, но и сходные механизмы преодоления этой защиты самими патогенами.

Ранее было показано, что мыши линий I/St (I/StSnEgYCit) и B6 сильно различаются по уровню резистентности к инфекции, вызываемой *M. avium* [10]. При респираторном заражении в легких мышей B6 развивается инфекция, приводящая к длительной инфильтрации ткани легкого макрофагами и нейтрофилами, развитию некротических легочных гранулем и гибели животных. При аналогичном заражении мышей I/St инфекция носит контролируемый характер, характеризуется умеренной инфильтрацией ткани легкого, появлением мелких и средних гранулем, не имеющих некротического центра, и не приводит к гибели животных. Было показано, что восприимчивость мышей линии B6 к инфекции, вызываемой *M. avium*, связана с тем, что в геноме мышей этой линии имеется нефункциональный аллель гена *Nramp1* (natural resistance-associated macrophage protein-1). Белок, кодируемый геном *Nramp1*, состоит из 12 трансмембранных доменов и экспрессируется на мембранах поздних лизосом и фагосом. Функционально *Nramp1* осуществляет транспорт двухвалентных катионов (Fe^{2+} , Mn^{2+} и др.) из фагосом, тем самым лишая микобактерии необходимых для их функционирования метаболитов [10].

Иммунный ответ у мышей B6 характеризуется повышенной продукцией IFN- γ , TNF- α и, особенно, IL-12. Мы предполагаем, что разный характер иммунного ответа на инфекции *M. avium* находит отражение в разном профиле экспрессии генов возбудителя в легких и лимфоидных органах у чувствительных и резистентных линий мышей – механизмы, необходимые при выживании в резистентном хозяине, могут не включаться при паразитировании в чувствительном.

С целью выявления особенностей биохимических процессов, связанных с адаптацией *M. avium* к генетически разным организмам-хозяевам, нами проведено сравнительное изучение последовательностей, транскрибирующихся при заражении мышей линий I/St и B6 на 13-й неделе развития инфекции.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Стандартные процедуры работы с ДНК и РНК осуществлялись согласно [11]. Геномная ДНК *M. avium* штамма 724R была выделена согласно [12].

Инфицирование мышей

Мыши линий I/StSnEgYCit (I/St) и C57BL/6YCit (B6) выращивались в стандартных условиях в вива-

рии ЦНИИТ. Самок возраста 2.5–3.0 мес. подвергали аэрозольному заражению вирулентным штаммом 724R *M. avium*, охарактеризованным в [13]. Мышей инфицировали с помощью системы ингаляции (Glas-Col, США) $1-2 \times 10^3$ колонийформирующих единиц *M. avium* как описано в [10].

Выделение РНК и синтез кДНК

РНК была выделена из легких мышей обеих линий через 13 недель с момента заражения с помощью набора реактивов RNA Isolation System (Promega, США). Образцы РНК были обработаны ДНКазой I (MBI Fermentas, Литва) для удаления следов ДНК. Первая цепь кДНК была построена с использованием олигонуклеотидных праймеров BR (5' AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(N)₉) и SMART (5' AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCrGrGrG). Оба праймера (концентрация 12 мкМ) отжигали с 2 мкг тотальной РНК в растворе объемом 11 мкл. Смесь инкубировали 2 мин при 70°C, затем помещали в лед на 10 мин. Синтез кДНК осуществляли с помощью обратной транскриптазы PowerScript II (Clontech, США). Параллельно с реакцией обратной транскрипции (RT+) проводили контрольную реакцию (RT-) без добавления обратной транскриптазы. Реакционные смеси RT+ и RT- инкубировали при 37°C в течение 10 мин, затем 40 мин при 42°C. Для препаративного синтеза кДНК проводили 30 циклов ПЦР (95°C 20 с, 64°C 20 с и 72°C 2 мин) с использованием праймеров 5S (5' GTGGTATCAACGCAGAGT). кДНК очищали набором реактивов QIAquick PCR Purification kit (Qiagen, США).

Клонирование идентичных последовательностей (coincidence cloning) проводили по методике, описанной в [14]. Геномную ДНК *M. avium* штамм 724R и образцы тотальных (т.е. синтезированных на матрицах тотальной РНК) кДНК фрагментировали рестриктазами RsaI и AluI. Полученные фрагменты геномной ДНК лигировали с супрессионными адаптерами 1A для гибридизации с образцом кДНК I/St и адаптерами 1B для гибридизации с образцом кДНК B6 (табл. 1). Фрагменты кДНК, полученные из легочной ткани мышей I/St и B6, лигировали с супрессионными адаптерами 2A и 2B соответственно. Смесь, содержащую 100 нг образца геномной ДНК и 100 нг одного из образцов кДНК в 2 мкл гибридизационного буфера (50 мМ HEPES, pH 8.3; 0.5 М NaCl; 0.02 мМ EDTA, pH 8.0), инкубировали при 99°C в течение 5 мин (денатурация), а затем при 68°C в течение 18 ч (ренатурация). Затем в реакционную смесь добавляли 100 мкл нагретого до 68°C гибридизационного буфера и 1 мкл полученного раствора использовали в качестве матрицы для проведения ПЦР. Первый раунд ПЦР осуществляли в реакционном объеме

Таблица 1. Олигонуклеотиды и праймеры, использовавшиеся для клонирования идентичных последовательностей

	Название	Структура 5'-3'
Супрессионный адаптер 1А (получен отжигом эквимольной смеси олигонуклеотидов 1А long и 1А short)	1А long	GТААТАСГАСТСАСТАТАGGGСAGСGTGGТСGСGGССGAGAG
	1А short	СТСТСGGССG
Супрессионный адаптер 1В	1В long	GТААТАСГАСТСАСТАТАGGGСAGGGСGTGGТGСGGAGGGСGGС
	1В short	GССGGСССТСС
Супрессионный адаптер 2А	2А long	GТААТАСГАСТСАСТАТАGGGСAGGСaGGСGGТGGТGGGСA-GGС
	2А short	GССТGСССАС
Супрессионный адаптер 2В	2В long	GТААТАСГАСТСАСТАТАGGGСAGСGGAGGСGGТAGGAGGGС-GGA
	2В short	TССGССТССТ
Внешний праймер	T7	GТААТАСГАСТСАСТАТАGGGС
Внутренние праймеры	pr1А	AGСGTGGТСGСGGССGAGAG
	pr1В	AGGGСGTGGТGСGGAGGGСGGС
	pr2А	AGGСAGGСGGТGGТGGGСAGGС
	pr2В	AGСGGAGGСGGТAGGAGGСGGA

25 мкл, содержащем 10 пмоль праймера Т7. После преинкубации в течение 5 мин при 72°C (достройка липких концов) было проведено 20 циклов амплификации (94°C 30 с, 66°C 30 с, 72°C 90 с). Вторая стадия амплификации проводилась с 10 пмоль внутренних праймеров pr1А/pr1В и pr2А/pr2В и состояла из 25 циклов (94°C 30 с, 68°C 30 с, 72°C 90 с). В качестве матрицы использовали ПЦР-продукт 1-го раунда, разведенный в 10 раз. Амплификат очищали с помощью набора реактивов QIAquick PCR Purification kit (Qiagen) и использовали для 454 секвенирования.

454 секвенирование

Нуклеотидные последовательности библиотек кДНК были определены массивным параллельным пиросеквенированием с помощью генетического анализатора GS FLX (Roche, Германия) и 20x75 см пикотитровальной плашки. Последовательности были прочитаны в 83 000 независимых реакциях. Картирование полученных последовательностей осуществлялось на последовательность генома *M. avium* штамма 104, так как геном *M. avium* 724R к настоящему моменту не секвенирован. Число фрагментов кДНК, соответствующих каждому гену, было определено с помощью алгоритма BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Последовательность признавалась принадлежащей определенному гену, если какой-либо фрагмент этой последовательности имел более чем 95% гомологию с сегментом гена длиной более 40 нуклеотидов. Поиск генов *M. avium*, разница в экс-

прессии которых в образцах I/St и В6 статистически достоверна, осуществляли согласно [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Особенности патологии и развития иммунного ответа при заражении *M. avium* чувствительной (В6) и резистентной (I/St) линий мышей подробно описаны в [10, 16]. При аэрогенном способе заражения чувствительные мыши В6 погибали уже через 7 мес. после заражения, в то время как резистентные мыши I/St жили свыше 11 мес. Агрессивное течение инфекции у чувствительных мышей В6 характеризовалось быстрым развитием легочной патологии на фоне усиленной инфильтрации ткани легкого клетками иммунной системы и повышения продукции провоспалительных цитокинов IFN-γ, TNF-α, IL-6 и IL-12. Наблюдалась отчетливая корреляция двух параметров чувствительности к заражению: более быстрый рост *M. avium* в легких и большая выраженность легочной патологии у мышей чувствительной линии В6 по сравнению с резистентными мышами I/St.

Получение данных о последовательностях, транскрибирующихся *in vivo*, было проведено разработанным нами методом клонирования идентичных последовательностей [14, 17]. Для этого была выделена тотальная РНК из инфицированных легких мышей, которая представляет собой смесь мышинной и бактериальной РНК, при этом количество бактериальной РНК ничтожно мало, не более 0.1–0.2% [18]. Из образцов тотальной РНК I/St и В6 синтезирована тоталь-

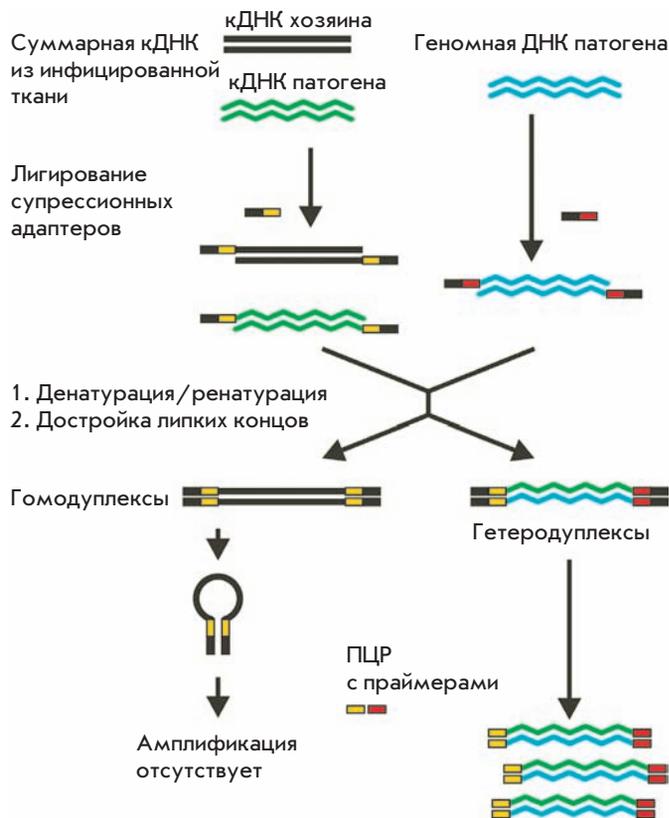


Рис. 1. Клонирование идентичных последовательностей. К фрагментам геномной ДНК патогена и тотальной кДНК лигируют специфические олигонуклеотидные адаптеры. После совместной денатурации и ренатурации в смеси образуется два типа дуплексов. Благодаря эффекту супрессии ПЦР амплифицируются только гетеродуплексы, содержащие фрагменты кДНК и геномной ДНК патогена.

ная кДНК. Метод coincidence cloning, представленный на рис. 1, заключается в совместной денатурации и ренатурации фрагментированных суммарной кДНК и геномной ДНК *M. avium*. После проведения двух раундов селективной ПЦР-амплификации был получен набор фрагментов, обогащенный фрагментами бактериальной кДНК.

Для проведения качественного (определение нуклеотидных последовательностей специфически экспрессирующихся генов) и количественного (уровень их экспрессии) анализа полученных наборов был использован метод параллельного пиросеквенирования.

В результате секвенирования были получены две библиотеки последовательностей кДНК *M. avium*, экспрессирующихся в ткани легких при инфекции мышей I/St и B6. Был отобран ряд геномных локусов, повышенно экспрессирующихся в образце I/St по сравнению с образцом B6, и геномных локусов, по-

Таблица 2. Гены *M. avium*, дифференциально транскрибирующиеся в легких инфицированных мышей линий I/St и B6

Ген	Кодируемый белок
Повышенная экспрессия в легких мышей I/St	
MAV_2015	MbtG; лизин-N-оксигеназа микобактина
MAV_1696	Глутаматдегидрогеназа
MAV_1304	NarH; нитратредуктаза, β-субъединица
MAV_2379	MetH; витамин B ₁₂ -зависимая метионинсинтаза
MAV_2385	Белок семейства Mse
MAV_2063	Белок семейства Mse
MAV_2386	Белок семейства Mse
MAV_0118	Белок семейства PPE
MAV_3109	RifB; поликетидсинтаза 7
MAV_0880	3-Кетостероид-δ-1-дегидрогеназа
MAV_3000	Ацил-СоА-синтетаза
MAV_4019	Предполагаемая ацил-СоА-дегидрогеназа
MAV_4679	Циклопропан-ЖК-синтаза 1
Повышенная экспрессия в легких мышей B6	
MAV_2514	Белок семейства PPE
MAV_2924	Белок семейства PPE
MAV_2926	Белок семейства PPE
MAV_2244	GlnA; глутаминсинтетаза
MAV_4011	NO-редуктаза, β-субъединица
MAV_1074	SucC; сукцинил-СоА-синтетаза, β-субъединица
MAV_3303	AscA; аконитат-гидратаза
MAV_1130	NADH-дегидрогеназа I, H-субъединица
MAV_4040	NADH-дегидрогеназа I, H-субъединица
MAV_1524	АТФ-синтаза F ₁ F ₀ , δ-субъединица
MAV_5034	Транспозаза
MAV_1059	Транспозаза

вышенно экспрессирующихся в образце B6 по сравнению с I/St (табл. 2). Аннотация локусов проводилась с помощью базы данных KEGG (www.genome.jp/kegg). Мы предполагаем, что дифференциальная экспрессия какого-либо гена в сравниваемых образцах может являться адаптацией к условиям, в которых существует микроорганизм, поэтому продукты генов, обнаруженных нами, представляют интерес как потенциальные факторы вирулентности.

Была обнаружена дифференциальная экспрессия генов семейства PPE (*MAV_0118*, *MAV_2514*, *MAV_2924* и *MAV_2926*). Эти белки играют важную роль при развитии микобактериальной инфекции как с антигенной, так и с иммунологической точки зрения. Это кислые глицин-богатые белки, идентифицируемые по специфическим доменам Pro-Pro-Glu (семейство PPE) и Pro-Glu (семейство PE), часто содержащие полиморфные повторяющиеся последовательности (PGRSs) и множественные копии основных полиморфных тандемных повторов. Предполагается, что эти белки экспрессируются на клеточной поверхности, обуславливая антигенную вариабельность, вызывающую различные иммунные ответы в зависимости от того, какой тип PE/PPE белков экспрессируется на клеточной поверхности [19]. Ген *MAV_0118* экспрессируется при персистенции в мышце резистентной линии, а *MAV_2514*, *MAV_2926* и *MAV_2924* – восприимчивой. Так как механизм действия белков PPE неизвестен, этому трудно дать объяснение, но, возможно, экспрессия разных белков PPE связана с разным типом иммунного ответа.

Генный локус *MAV_2244* повышенно экспрессируется в образце В6. Этот ген является ортологом гена *glnA1* *M. tuberculosis* и кодирует глутаминсинтетазу, ключевой фермент в ассимиляции азота. Показано, что этот фермент необходим для персистенции *M. tuberculosis* в макрофагах. Вероятно, при заражении мышей линии В6 *M. avium* оказывается в среде, ауксотрофной по L-глутамину [20]. Заслуживает упоминания генный локус *MAV_4011*, кодирующий цитохром b-содержащую субъединицу NO-редуктазы. Этот фермент способен восстанавливать NO в N₂O. В некоторых почвенных микроорганизмах этот фермент участвует в денитрификации. Однако в *M. avium* из мышей В6, восприимчивых к инфекции, денитрификация не происходит. Предполагается, что NO-редуктаза позволяет *M. avium* разлагать NO, выделяемый макрофагом в пространство эндосом, и избегать его разрушительного действия [21]. Вероятно, именно этим объясняется устойчивость *M. avium* к воздействию NO [22]. Экспрессию NO-редуктазы в *M. avium* из легких восприимчивой к инфекции мыши можно объяснить тем, что иммунный ответ в этом случае развивается сильнее, и повышается выработка NO макрофагами.

В образце В6 гораздо активнее и разнообразнее экспрессируются гены, кодирующие ферменты цикла Кребса: *MAV_1074* и *MAV_3303*, кодирующие сукцинил-СоА-синтетазу и аконитат-гидратазу соответственно; а также гены, кодирующие белки, необходимые для окислительного фосфорилирования, и белки дыхательной электрон-транспортной цепи (ЭТЦ): *MAV_1130*, *MAV_4040* и *MAV_1524*. Вероятно,

при персистенции в мышцах восприимчивой линии повышается уровень дыхания для обеспечения энергетических потребностей патогена. Ген локуса *MAV_4040* кодирует одну из субъединиц NADH-дегидрогеназы I типа, что характерно для острой фазы инфекции, вызываемой *M. tuberculosis*, и экспоненциального размножения патогена [23].

Экспрессия генов *MAV_5034* и *MAV_1059*, кодирующих транспозазы в образце В6, свидетельствует о повышенном уровне генетических перестроек. В этом же образце наблюдается повышенная экспрессия генов *MAV_5024* и *MAV_5027*, кодирующих ферменты рестрикции-модификации II типа, функция которых – защита от проникновения чужеродной ДНК в клетку.

Повышенная экспрессия генов *MAV_0382* (субъединицы ДНК-полимеразы III) и *MAV_4450* (белок рибосомы) в образце В6 свидетельствует о повышении уровня репликации ДНК, связанном с большей частотой деления клеток, и повышении уровня трансляции.

В образце I/St наблюдается очень высокий уровень экспрессии гена *MAV_2015*, кодирующего фермент микобактин-лизин-N-оксигеназу (MbtG). Этот фермент осуществляет одну из последних стадий синтеза микобактина, хелатирующего железо агента, позволяющего микроорганизму добывать железо из окружающей среды [24]. Для *M. tuberculosis* показано, что активация транскрипции кластера генов *mbt B-H*, участвующих в синтезе микобактина, происходит либо при недостатке железа в окружающей среде [25], либо при попадании в анаэробную среду обитания [26]. Этот ген высоко экспрессируется в *M. avium* из резистентной линии мышей I/St, но практически не экспрессируется в В6. Как уже упоминалось, эти линии мышей отличаются аллелем гена *Nramp1*, кодирующего ионный насос, предположительно выкачивающий двухвалентные катионы из пространства эндосом, в которых находится *M. avium* [16]. Мыши линии I/St имеют функциональный аллель этого гена, а линии В6 – нефункциональный. По-видимому, в эндосоме *M. avium* из резистентной мыши наблюдается дефицит железа, и микроорганизм вынужден синтезировать огромное количество молекул микобактина, чтобы восполнить его недостаток.

В *M. avium* из мышей I/St наблюдается повышенная экспрессия гена *MAV_1696*, кодирующего NAD⁺-зависимую глутаматдегидрогеназу. Считается, что, в отличие от NADP⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы, осуществляющей ассимиляцию азота, у микроорганизмов этот фермент участвует в катаболизме глутамата, и экспрессия этого гена не зависит от концентрации NH₄⁺. Однако недавно у *M. smeg-*

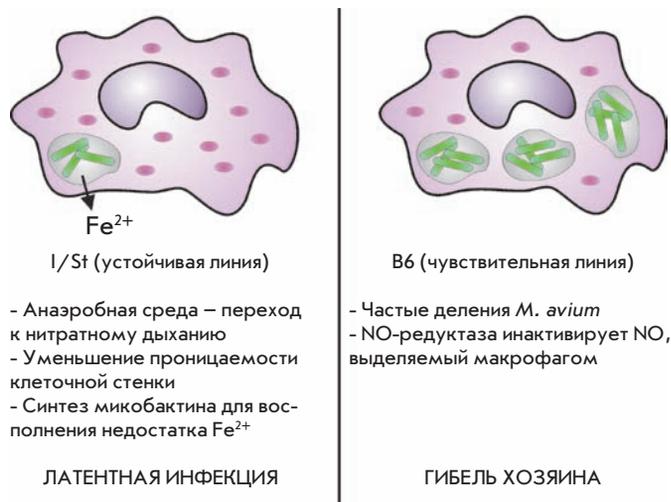


Рис. 2. Метаболическое состояние микобактерий в макрофагах мышей различных линий.

matis было показано повышение экспрессии гена *msmeg_4699*, ортологичного *MAV_1696*, возникающее в ответ на дефицит NH₄⁺ в окружающей среде [27]. Кроме того, в геноме *M. avium* отсутствует ген, кодирующий NADP⁺-зависимую глутаматдегидрогеназу [28]. Существует предположение, что у микобактерий NAD⁺-зависимая глутаматдегидрогеназа может играть роль в ассимилировании азота с гораздо меньшими энергетическими затратами, чем с помощью GS/GOGAT-пути, что необходимо, например, при латентном состоянии патогена [27].

Ген *MAV_2379*, кодирующий B₁₂-зависимую метионинсинтазу MetH, повышенно экспрессируется в *M. avium* из мыши I/St. Этот белок участвует в заключительной стадии синтеза метионина. В геноме *M. avium* эту же реакцию осуществляет MetE-B₁₂-независимая метионинсинтаза, экспрессия которой при наличии в среде витамина B₁₂ подавлена [29]. Регуляция экспрессии гена *metH* не изучена, и повышение его экспрессии в резистентной мыши не совсем понятно.

Ген локуса *MAV_1304*, кодирующий β-субъединицу нитратредуктазы, представляет особый интерес. Этот ген является ортологом гена *narH* *M. tuberculosis*. Продуктом этого гена является одна из субъединиц анаэробной нитрат-редуктазы NarGHJI, фермента, позволяющего осуществлять нитратное дыхание в отсутствие кислорода. Мутанты, лишённые NarH, утрачивают способность восстанавливать азот в анаэробных условиях [30]. При делеции этого гена в *M. bovis* BCG бактерии нормально росли *in vitro* при достаточном уровне кислорода, но показывали крайне ослабленную вирулентность при заражении мышей [31]. Экспрессия гена *MAV_1304* в *M. avium* в легких

I/St может свидетельствовать о том, что в результате негативного воздействия защитных систем хозяина микроорганизм оказывается в анаэробных условиях и вынужден переходить на нитратное дыхание.

Гены локусов *MAV_2063*, *MAV_2385* и *MAV_2386*, кодирующие белки семейства Mse, экспрессируются при заражении резистентной линии мышей. Функция белков Mse не установлена экспериментально, но известно, что они обеспечивают свойства инвазивности. Предполагается, что эти белки представляют собой новую группу ABC-транспортёров, участвующих в ремоделировании клеточной мембраны [32].

Генный локус *MAV_4679*, кодирующий фермент, участвующий в синтезе миколовых кислот, повышенно экспрессируется в *M. avium* из мышей I/St. Ортолог этого гена у *M. tuberculosis* необходим для персистенции в легких мышей. Мутанты по этому гену не способны вызывать легочную инфекцию у мышей [33].

Генный локус *MAV_3109* кодирует белок RifB и является ортологом гена *pks7* *M. tuberculosis*. Повышенная экспрессия этого гена наблюдается при инфицировании мыши устойчивой линии. Белковый продукт этого гена кодирует один из ферментов, участвующих в синтезе фтиоцеролдимикоцерозата, одного из компонентов клеточной микобактериальной стенки, обеспечивающий ее непроницаемость [34].

Ген локуса *MAV_0880* кодирует 3-кетостероид-δ-1-дегидрогеназу, один из ферментов, осуществляющих катаболизм холестерина. При инфекции, вызываемой *M. tuberculosis*, холестерин служит источником энергии для патогена при персистенции в макрофагах [35]. В *M. avium* из мыши I/St отмечена повышенная экспрессия генов *MAV_3000* и *MAV_4019*, кодирующих ферменты деградации жирных кислот: ацил-СоА-дегидрогеназу и ацил-СоА-синтетазу. Известно, что при персистенции в макрофагах катаболизм жирных кислот становится основным источником энергии для *M. tuberculosis* [36].

ВЫВОДЫ

Представленная работа является первым описанием транскриптома *M. avium* в условиях инфекции *in vivo*. К настоящему моменту имеется лишь одна публикация, описывающая транскрипционный ответ *M. avium paratuberculosis* на воздействие различных факторов *in vitro* [37].

Мы использовали модель генетического контроля чувствительности к инфекции *M. avium* и тяжести заболевания у мышей для поиска последовательностей, дифференциально транскрибирующихся при заражении генетически резистентных и генетически чувствительных линий мышей, т.е. при пер-

систировании патогена в условиях генетически различного микроокружения. Нами получены сведения о качественных и количественных различиях в профилях транскрипции генов бактерии при персистенции в резистентной и восприимчивой к инфекции линиях мышей, указывающие на изменения в метаболизме *M. avium* (рис. 2).

При развитии инфекции в генетически восприимчивом организме (линия В6) отмечена повышенная экспрессия ряда генов, отвечающих за ассимиляцию азота, восстановление NO, осуществление цикла Кребса и окислительного фосфорилирования, репликацию и трансляцию. Инфекция характеризуется активным делением микобактерии и гибелью организма хозяина.

При развитии инфекции в резистентном организме (линия I/St) отмечена повышенная экспрессия ряда генов, отвечающих за изменение свойств клеточной

поверхности, переход к анаэробному нитратному дыханию, деградацию жирных кислот, синтез полициклических производных жирных кислот, биосинтез микобактина и других поликетидов. В целом, изменения метаболизма *M. avium* свидетельствуют о том, что в организме мыши устойчивой линии наблюдается переход бактериального патогена к латентному состоянию, вызванный дефицитом ионов двухвалентных металлов. ●

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 08-04-01053), Программой поддержки ведущих научных школ России (проект НШ-5638.2010.4), Программой «Молекулярная и клеточная биология» Президиума РАН, а также грантом Национального института здоровья США (НИH; grant no.AI078864, А.С. Ант).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Horsburgh C.R., Jr. // *N. Engl. J. Med.* 1991. V. 324. P. 1332-1338.
- Inderlied C.B., Kemper C.A., Bermudez L.E. // *Clin. Microbiol. Rev.* 1993. V. 6. P. 266-310.
- Nightingale S.D., Byrd L.T., Southern P.M., et al. // *J. Infect. Dis.* 1992. V. 165. P. 1082-1085.
- Benson C.A. // *Clin. Infect. Dis.* 1994. V. 18. Suppl 3. P. S218-222.
- Griffith D.E. // *Curr. Opin. Pulm. Med.* 1997. V. 3. P. 139-145.
- Nolt D., Michaels M.G., Wald E.R. // *Pediatrics.* 2003. V. 112. P. e434.
- Benini J., Ehlers E.M., Ehlers S. // *J. Pathol.* 1999. V. 189. P. 127-137.
- Rook G.A., Hernandez-Pando R. // *Annu. Rev. Microbiol.* 1996. V. 50. P. 259-284.
- Schluger N.W., Rom W.N. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998. V. 157. P. 679-691.
- Kondratieva E.V., Evstifeev V.V., Kondratieva T.K., et al. // *Infect. Immun.* 2007. V. 75. P. 4762-4768.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, N.Y.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Torrea G., Levee G., Grimont P., et al. // *J. Clin. Microbiol.* 1995. V. 33. P. 1899-1904.
- Pedrosa J., Florido M., Kunze Z.M., et al. // *Clin. Exp. Immunol.* 1994. V. 98. P. 210-216.
- Azhikina T., Skvortsov T., Radaeva T., et al. // *Biotechniques.* 2010. V. 48. P. 139-144.
- Audic S., Claverie J. // *Genome Research.* 1997. V. 7. P. 986.
- Kondratieva E., Logunova N., Majorov K., et al. // *PLoS One.* 2010. V. 5. P. e10515.
- Skvortsov T., Azhikina T. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2010. V. 36. P. 550-559.
- Banaiee N., Jacobs W.R., Jr., Ernst J.D. // *Infect. Immun.* 2006. V. 74. P. 6449-6457.
- Ramakrishnan L., Federspiel N.A., Falkow S. // *Science.* 2000. V. 288. P. 1436-1439.
- Tullius M.V., Harth G., Horwitz M.A. // *Infect. Immun.* 2003. V. 71. P. 3927-3936.
- Hendriks J., Oubrie A., Castresana J., et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2000. V. 1459. P. 266-273.
- Appelberg R. // *Immunol. Research.* 2006. V. 35. P. 179-190.
- Shi L., Sohaskey C.D., Kana B.D., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. P. 15629-15634.
- Ratledge C. // *Tuberculosis.* 2004. V. 84. P. 110-130.
- Gold B., Rodriguez G.M., Marras S.A.E., et al. // *Molecular Microbiology.* 2001. V. 42. P. 851-865.
- Bacon J., James B.W., Wernisch L., et al. // *Tuberculosis.* 2004. V. 84. P. 205-217.
- Harper C., Hayward D., Kidd M., et al. // *BMC Microbiology.* 2010. V. 10. P. 138.
- Amon J., Titgemeyer F., Burkovski A. // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2009. V. 17. P. 20-29.
- Warner D.F., Savvi S., Mizrahi V., Dawes S.S. // *J. Bacteriol.* 2007. V. 189. P. 3655-3659.
- Malm S., Tiffert Y., Micklinghoff J., et al. // *Microbiology.* 2009. V. 155. P. 1332-1339.
- Weber I., Fritz C., Ruttkowski S., et al. // *Mol. Microbiol.* 2000. V. 35. P. 1017-1025.
- Casali N., White A.M., Riley L.W. // *J. Bacteriol.* 2006. V. 188. P. 441-449.
- Glickman M.S., Cox J.S., Jacobs W.R. // *Mol. Cell.* 2000. V. 5. P. 717-727.
- Waddell S.J., Chung G.A., Gibson K.J., et al. // *Letts. Appl. Microbiol.* 2005. V. 40. P. 201-206.
- van der Geize R., Yam K., Heuser T., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. P. 1947-1952.
- Muñoz-Elias E., McKinney J. // *Nature Medicine.* 2005. V. 11. P. 638-644.
- Wu C.W., Schmoller S.K., Shin S.J., Talaat A.M. // *J. Bacteriol.* 2007. V. 189. P. 7877-7886.

УДК 57.083:571.27:579.69

Фингерпринтный анализ селекции наноантител методом фагового дисплея с использованием двух вариантов фагов-помощников

С. В. Тиллиб*, Т. И. Иванова, Л. А. Васильев

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

*E-mail: tillib@genebiology.ru

Поступила в редакцию 06.07.2010 г.

РЕФЕРАТ Представленная работа посвящена анализу процесса селекции методом фагового дисплея нуклеотидных последовательностей мини-антител (наноантител) с заданной специфичностью на основе генерируемой библиотеки антигенсвязывающих доменов особых одноцепочечных антител иммунизированного верблюда. Проведено полномасштабное сравнение эффективности проводимой параллельно селекции с использованием как традиционного (M13KO7), так и модифицированного (с N-концевой делецией в поверхностном белке gIII) фагов-помощников. Показано, что это два взаимодополняющих метода, параллельное использование которых может заметно повысить эффективность селекции. С целью идентификации индивидуальных вариантов отбираемых клонов предложен метод параллельного рестрикционного анализа (фингерпринтирования) амплифицированных с помощью ПЦР клонированных последовательностей, кодирующих мини-антитела, – HMR-анализ, частично заменяющий секвенирование. Получены уникальные данные об отборе вариантов мини-антител с требуемой специфичностью на разных стадиях многостадийной процедуры селекции. Продемонстрирован дифференциальный характер отбора вариантов последовательностей, кодирующих мини-антитела, на разных стадиях селекции, игнорирование чего может вести к потере некоторых вариантов искомым мини-антител.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА иммунизация, фаговый дисплей, фаг-помощник, рекомбинантное мини-антитело, фингерпринтирование.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ИФА – иммуноферментный анализ; БСА – бычий сывороточный альбумин; hp – фаг-помощник; ПЦР – полимеразная цепная реакция; HA-таг – антигенная детерминанта, фрагмент из 9 аминокислот (YR_YDV_PD_YA) белка гемагглютинирина вируса гриппа, который эффективно узнается коммерчески доступными антителами; HMR-анализ – предложенный в данной работе метод параллельного рестрикционного анализа последовательностей генов мини-антител с использованием трех рестриктаз (HinfI, MspI, RsaI); TNF, или TNF- α – фактор некроза опухоли (фактор некроза опухоли- α , англ. tumor necrosis factor) – внеклеточный многофункциональный провоспалительный цитокин; PBS – натрий-фосфатный буферный раствор (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7.4).

ВВЕДЕНИЕ

Данная работа выполнена в рамках проектов, посвященных разработке новых средств пассивной иммунизации для профилактики и иммунотерапии инфекционных заболеваний человека и животных, в частности бешенства и сибирской язвы. В представленной статье основное внимание уделено анализу отбираемых вариантов последовательностей, кодирующих особые мини-антитела, на различных этапах процедуры селекции, базирующейся на технологии фагового дисплея [1–3].

Начав в 2003 г. с совместной работы с лабораторией проф. С. Муилдерманса (S. Muyldermans, Vrije Universiteit Brussel, Belgium), вот уже несколько лет мы разрабатываем и используем для решения разнообразных задач новую перспективную технологию генерирования особых верблужьих одноцепочечных мини-антител (наноантител, или nanobodies®).

Наноантитела представляют собой антиген-узнающие молекулы – фрагменты (вариабельные домены) особых антител, встречающихся (наряду с классическими антителами) в природе лишь у пред-

ставителей семейства Верблюдовых и некоторых видов акул [4, 5]. Эти «верблюдоспецифические» антигена состоят из димера только одной укороченной (без первого константного района СН1) тяжелой цепи иммуноглобулина и полнофункциональны в отсутствие легкой цепи иммуноглобулина. Для собственно специфического узнавания и связывания антигена при этом необходим и достаточен лишь один вариабельный домен этого антитела. Генерируемые одноцепочечные мини-антитела, в отличие от большинства чисто рекомбинантных антител, обычно обладают весьма высоким сродством к заданному антигену благодаря тому, что первая стадия их получения протекает в организме животного (из сем. Верблюдовых), где происходит их аффинное созревание *in vivo*. По сравнению с традиционными антителами наноантитела обладают рядом преимуществ, что позволяет предполагать большой потенциал их будущего использования в различных исследованиях и при создании новых биотехнологических устройств, а также в клинических целях для диагностики и лечения заболеваний. В число этих преимуществ входят меньший размер и новые структурные особенности (лучшее проникновение внутрь ткани, узнавание скрытых для обычных антител эпитопов), экономичность и простота наработки в больших количествах (в бактериях или дрожжах), хорошая растворимость, устойчивость к значительным колебаниям температуры и рН, простота всевозможных генно-инженерных манипуляций [5, 6]. Важно отметить, что верблюжьи вариабельные домены не вызывают выраженного иммунного ответа у приматов, и по структуре они весьма гомологичны вариабельным доменам одного из классов иммуноглобулинов (IgG3) человека. Было показано [7], что можно «гуманизировать» такие верблюжьи мини-антитела без заметной потери их специфической активности, проведя небольшое число точечных замен аминокислот. Это открывает потенциальную возможность широкого использования мини-антител в качестве средств пассивной иммунизации для предотвращения развития различных опасных инфекционных заболеваний [5, 7–9].

Если первой принципиальной стадией получения наноантител в используемом нами методе является индукция образования специфических антител в организме верблюда (или ламы) в результате иммунизации, то вторая принципиальная стадия – собственно отбор методом фагового дисплея клонов нуклеотидных последовательностей заданных наноантител из генерируемой библиотеки всего репертуара вариабельных доменов особых антител данного иммунизированного животного. Эта стадия селекции совсем не тривиальна и весьма слабо исследована. В данной работе мы тщательно проследили как идет отбор заданных последовательностей, а также срав-

нили методы, в которых используются два разных фага-помощника. В недавно опубликованной работе [10] мы предложили использовать модифицированную версию фага-помощника для повышения эффективности отбора антиген-узнающих доменов особых одноцепочечных верблюжьих антител (наноантител) методом фагового дисплея на основе нитчатого фага M13. Использование в качестве фага-помощника мутантного фага M13KO7, названного hrΔMVPIII (содержит делецию N-концевой области белка gIII фага M13, что нарушает способность фага заражать клетки бактерий, но не мешает формированию фаговой частицы), потенциально может заметно повысить эффективность процедуры селекции. Это было продемонстрировано на модельной системе, включающей финальную (третью) стадию селекции наноантител, связывающихся с фактором некроза опухолей, TNF-α, из библиотеки, уже предварительно специфически обогащенной в ходе двух традиционных процедур селекции. В данной работе проведено полномасштабное сравнение эффективности селекции с использованием как традиционного, так и мутированного фага-помощника.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Антигены и иммунизация верблюда

В качестве антигенов для иммунизации верблюда использовали препарат вируса бешенства и синтезированный в бактериальной экспрессионной системе рекомбинантный белок, соответствующий летальному фактору сибирской язвы (*Bacillus anthracis*). Летальный фактор любезно предоставлен А. Колесниковым из лаборатории биокатализа Института биоорганической химии РАН. Для получения препарата вируса бешенства использовали произведенную на биофабрике в г. Покрове Владимирской области антирабическую вакцину на основе инактивированного специального аттенуированного (ослабленного) штамма РВ 71/10 вируса бешенства. Этот препарат любезно предоставлен проф. Б.С. Народицким из Научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии РАМН. Препарат вируса бешенства дополнительно очищали от белков культуральной среды с помощью ультрафильтрации через мембрану, пропускающую молекулы и частицы размером менее 300 кДа (Vivaspin 20 ml Concentrator, VS 2051, Vivascience, USA) и задерживающую вирусные частицы, имеющие существенно больший размер. Параллельно препарат вируса концентрировали (примерно до 10^7 инфекционных частиц в 10 мл стандартного солевого раствора PBS). Полученный препарат разделяли на шесть равных частей и замораживали для хранения при -70°C (пять частей – для пяти последовательных инъекций (им-

мунизация), еще одна часть – для селекции и анализа заданных мини-антител). Перед проведением каждого этапа иммунизации одну из хранящихся при -70°C аликвот препарата размораживали, добавляли 650 мкг летального фактора сибирской язвы и смешивали в равных пропорциях с адъювантом Фрейнда. Таким образом была проведена пятиэтапная процедура иммунизации двугорбого верблюда *Camelus bactrianus* (самка 6 лет) смесью двух указанных выше препаратов (антигенов), смешанных в равных пропорциях с адъювантом Фрейнда (полным – только при первой инъекции, затем 4 раза – с неполным). Вторую инъекцию проводили через 4 недели после первой, а последующие три инъекции – через 10 дней, одна после другой. Взятие крови производили через 5 дней после последней инъекции.

Получение библиотеки нуклеотидных последовательностей наноантител

По традиционной схеме (выделение РНК, синтез кДНК, двухстадийная ПЦР со специфическими праймерами, рестрикция и очистка вставок, встраивание вставок в фагмидный вектор [11–14]) осуществлено клонирование ДНК всего репертуара переменных доменов особых одноцепочечных антител из В-лимфоцитов периферической крови иммунизированного верблюда. В результате получили новую специфически обогащенную библиотеку нуклеотидных последовательностей мини-антител в фагмидном векторе рHEN4 [11]. Следует отметить, что эта библиотека состояла из двух подбиблиотек, различающихся сайтами узнавания рестрикционных эндонуклеаз используемых для встраивания последовательностей, кодирующих антиген-узнающие домены, в фагмидный вектор: а) NcoI + NotI и б) PstI + NotI. Рекомбинантными плазмидными ДНК, полученными в результате лигирования двух подбиблиотек вставок и двух соответствующих векторных последовательностей, методом электропорации трансформировали клетки *Escherichia coli* (штамм TG1). Стандартные процедуры клонирования, работы с бактериями и бактериофагом M13 проводили как описано ранее [15, 16]. «Базовая библиотека наноантител иммунизированного верблюда» вполне соответствовала предъявляемым требованиям ($\sim 10^7$ клонов, процент вставок ожидаемого размера – около 80%). Она была использована для отбора искомым наноантител.

Селекция наноантител методом фагового дисплея

Селекцию (паннинг) верблюжьих мини-антител (наноантител) методом фагового дисплея, а также наработку наноантител в периплазме бактерий и анализ способности наработанных наноантител узнавать заданный антиген проводили, как описано ранее [11–

14], с указанными ниже модификациями. Использовали (на стадии селекции и для ИФА) полистирольные иммунологические плашки с высокой сорбцией MICROLON 600 (Greiner Bio-One). Для блокировки применяли 5% обезжиренное молоко (Bio-Rad) или 1% БСА (Sigma-Aldrich) в стандартном солевом растворе (PBS). Рабочая концентрация ампициллина – 100 мкг/мл, канамицина – 70 мкг/мл.

В работе использовали штамм *E. coli* K12 / TG1 {*supE thi-1 (lac-proAB) (mcrB-hsdSM)5(rK- mK-)* [*F' traD36 proAB lacIqZ M15*]} (Stratagene) и штамм *E. coli* K12 / WK6 { $\Delta(lac-pro)$, *galE*, *strA*, *nal*; *F' lacIq ZM15, pro+*} [17], а также бактериофаг M13KO7 ([18], New England Biolabs) и фагмиду рHEN4 [11]. Штаммы *E. coli* и фагмида получены от проф. С. Муилдерманса (S. Muyldermans, Vrije Universiteit Brussel, Belgium). Модифицированный бактериофаг hp Δ MBpIII получен нами ранее [10] путем вырезания участка между сайтами MspAI (1634 п.н.) и BamHI (2221 п.н.) из геномной ДНК бактериофага M13KO7. Для наработки фага-помощника, соответствующего мутантному бактериофагу, проводили двухэтапную последовательную трансформацию клеток *E. coli* (штамм TG1). На первом этапе клетки трансформировали мутированной плазмидной ДНК рHEN4 Δ f1ori, из которой удален участок начала репликации нитчатого фага f1 (между сайтами EcoRI (1650) и Alw44I (2345)). Такая делеция приводит к тому, что плаزمида сохраняет способность к репликации как двухцепочечная ДНК (в ее составе остается соответствующий участок начала репликации), однако она теряет способность фагмиды к одноцепочечной репликации и уже не может упаковываться в фаговую частицу. На втором этапе клетки, содержащие рHEN4 Δ f1ori и, как следствие, устойчивые к ампициллину, трансформировали мутантной геномной ДНК (hp Δ MBpIII) бактериофага M13KO7 (двухцепочечной репликативной формой), содержащей ген устойчивости к канамицину. Затем клетки растили на среде, содержащей оба упомянутых антибиотика. Для наработки модифицированного фага-помощника использовали одну из выросших колоний клеток. Фаг наращивали в течение ночи в среде с канамицином и 1 мМ изопропил- β -D-1-тиогаляктопиранозидом (для активации синтеза белка gIII дикого типа, кодируемого рHEN4). Затем фаг очищали традиционным методом осаждения с полиэтиленгликолем [15, 16]. В результате получали модифицированный фаг, который способен эффективно заражать бактериальные клетки. Однако его геномная ДНК кодирует только мутантный белок gIII, что обеспечивает потерю дочерними фагами способности заражать клетки бактерий в отсутствие дополнительной плазмиды, кодирующей или gIII дикого типа, или gIII со встроенной последовательностью мини-антитела.

Селекцию (из одной и той же исходной библиотеки) наноантител, связывающихся с препаратом вируса бешенства, проводили параллельно двумя способами. В первом варианте использовали традиционный метод фагового дисплея с фагом-помощником M13KO7. В этом случае было проведено три цикла селекции/амплификации. В первом цикле в качестве блокирующего агента использовали 5% обезжиренное молоко (Bio-Rad Laboratories, США) в PBS, во втором – 1% БСА (Amresco, США) в PBS, в третьем – снова 5% молоко. Из внесенных в лунку с антигеном $\sim 10^{11}$ фаговых частиц исходной библиотеки после инкубации и отмывки в элюате в активном виде сохранились $\sim 10^6$ фаговых частиц, на втором этапе из $\sim 10^{11}$ фаговых частиц сохранились $\sim 10^7$ фаговых частиц, т.е. в ~ 10 раз больше, чем после первого этапа селекции. В результате третьего этапа после инкубации и отмывки в активном виде в элюате сохранились $\sim 10^8$ фаговых частиц, т.е. титр частиц заметно вырос по сравнению с предыдущим этапом. Это обычно свидетельствует о хорошем прохождении селекции и размножении специфически связывающихся фаговых частиц с экспонированными на их поверхности мини-антителами, которые, предположительно, и должны отвечать за это специфическое связывание. После последней элюции и нейтрализации раствор с фаговыми частицами в различных разведениях использовали для заражения клеток *E. coli* (штамм WK6), чтобы получить на чашке Петри отстоящие друг от друга колонии для финального анализа.

Параллельно с традиционной процедурой из той же исходной библиотеки проводили селекцию наноантител, связывающихся с препаратом вируса бешенства или с летальным фактором сибирской язвы, с помощью мутированного фага-помощника hrΔMBvIII с N-концевой делецией в поверхностном белке gIII [10]. Селекцию проводили аналогично описанной процедуре для традиционного фага-помощника. Следует отметить, что число вырастающих после каждого этапа селекции колоний (соответствует числу активных фаговых частиц с наноантителами) в этом случае было существенно меньшим (в 100 раз меньше после первого этапа и в 10 раз – после второго этапа селекции), чем в случае обычного фага-помощника. Модифицированный фаг-помощник был явно менее надежен для последующего заражения бактерий и амплификации элюированных фаговых частиц, что иногда отражалось в потере отбираемых клонов. Заражение клеток штамма WK6 такими модифицированными фагами после элюции, по-видимому, особенно малоэффективно (практически невозможно), поэтому для заражения элюированными фаговыми частицами, в том числе и после финальной селекции, использовали только клетки *E. coli* штамма TG1.

Периплазматический экстракт, содержащий мини-антитело с НА-тагом на С-конце, применяли для оценки специфичности и эффективности связывания наноантитела с препаратом иммобилизованного в иммунологической плашке антигена с помощью традиционного ИФА [13, 14]. В качестве вторичных антител к НА-тагу использовали конъюгированные с пероксидазой хрена анти-НА-моноклональные антитела (CHGT-45P-Z, ICL, Inc., США). Активность пероксидазы хрена определяли, используя в качестве хромогенного субстрата ABTS (2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфонат). Оптическую плотность измеряли при длине волны 405 нм с помощью планшетного флуориметра. Контрольные лунки не содержали антиген, но далее были блокированы и процессированы параллельно с экспериментальными ячейками (с антигеном). Число знаков «+» в графе «ИФА-сигнал» в табл. 1 и 2 коррелирует с относительной величиной поглощения в ИФА (суммарной эффективностью экспрессии/доступности и связывания наноантитела из периплазматического экстракта с иммобилизованным в лунке антигеном).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Метод NMR-анализа клонированных нуклеотидных последовательностей наноантител

Для промежуточного анализа отбираемых клонов мини-антител обычно используют ПЦР-амплификацию (непосредственно на материале отдельной колонии) нуклеотидной последовательности, кодирующей мини-антитело, с небольшими прилегающими участками фагамиды pHEN4, которая используется в качестве векторной. Получаемый ПЦР-продукт затем обрабатывают частощепящей рестрикционной эндонуклеазой (рестриктазой), как правило, HinfI. Последовательности, кодирующие наноантитела, имеют как относительно консервативные участки, содержащие «консервативные» сайты узнавания HinfI, так и достаточно протяженные гипервариабельные участки (из трех таких участков особенно протяженный третий, CDR3). В этих гипервариабельных участках заметно варьируют число и местоположение сайтов, узнаваемых частощепящими рестриктазами. Соответственно заметно варьируют число и размеры получающихся в результате расщепления фрагментов ДНК. Нами установлено, что для идентификации конкретного клона (варианта последовательности мини-антитела) значительно более надежно использовать параллельное расщепление ПЦР-продукта тремя различными рестриктазами (HinfI, MspI, RsaI).

В качестве праймеров для ПЦР-амплификации клонированной последовательности, кодирующей наноантитело, с небольшими прилегающими участками

Рис. 1. Данные НМР-анализа («НМР-фингерпринты») клонов исходной, полученной нами в результате иммунизации и последующего клонирования библиотеки мини-антител. Отобраны и проанализированы 94 клон. Выявлено 85 различных фингерпринтов, и только 9 из них, обозначенные на рисунке как (2х), повторяются дважды в данной выборке. Основная часть фингерпринтов соответствует клону, в которых встраивание последовательности, кодирующей наноантитело, в вектор проводилось по сайтам PstI–NotI. Меньшая часть фингерпринтов, обозначенных латинской буквой N, соответствует клонам, в которых встраивание последовательности наноантитела в вектор проводилось по сайтам NcoI–NotI. Подчеркиванием выделены варианты фингерпринтов, встретившиеся в каждой из двух подбиблиотек. Каждый фингерпринт представляет собой электрофореграмму, включающую (слева направо) три дорожки геля с разделенными ДНК после обработки ПЦР-продукта (последовательности наноантитела анализируемого клона) соответственно рестриктазами HinfI (H), MspI (M) или RsaI (R) и четвертую дорожку – с маркерной ДНК (размеры маркерных ДНК (п.о.) показаны в нижней части рисунка).

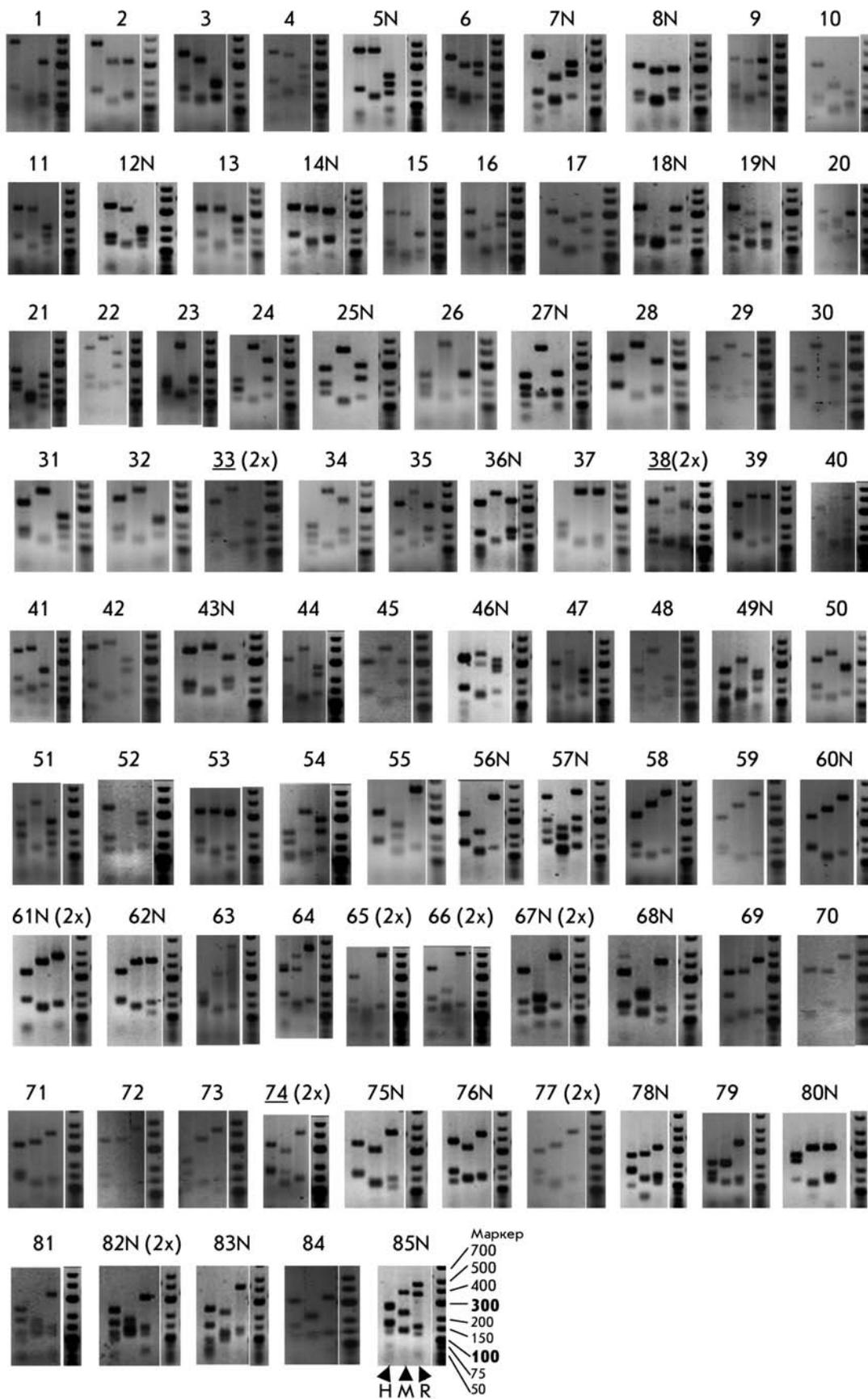


Таблица 1. Относительная представленность различных вариантов фингерпринтов отобранных клонов наноантител, узнающих летальный фактор сибирской язвы (alf), на различных этапах их селекции

Номер клона (alf №)	1 этап Норм. фаг-пом.	1 этап Мут. фаг-пом.	2 этап Норм. фаг-пом.	2 этап Мут. фаг-пом.	3 этап Норм. фаг-пом.	3 этап Мут. фаг-пом.	ИФА-сигнал
1	3/28	0/27	3/30	0/43	3/42	5/43	++
2	0/28	1/27	3/30	0/43	0/42	0/43	+++
3	1/28	0/27	0/30	0/43	3/42	3/43	++
4	2/28	0/27	0/30	0/43	1/42	0/43	+
5	2/28	0/27	0/30	1/43	0/42	1/43	+
6	3/28	0/27	12/30	0/43	12/42	13/43	++
7	0/28	0/27	0/30	0/43	0/42	1/43	+++
8	0/28	0/27	0/30	0/43	0/42	2/43	++
9	1/28	0/27	0/30	1/43	1/42	1/43	++
10	1/28	0/27	3/30	0/43	2/42	1/43	+++
11	0/28	0/27	0/30	0/43	0/42	1/43	++
12	0/28	0/27	0/30	0/43	1/42	1/43	++
13	1/28	0/27	2/30	0/43	6/42	2/43	++
14	0/28	0/27	2/30	1/43	2/42	2/43	+++

Примечание. Здесь и в табл. 2 жирным шрифтом выделены варианты клонов, которые использовали для наработки и анализа (ИФА) соответствующих наноантител. Количество знаков «+» коррелирует с относительным усилением сигнала (величиной поглощения) в ИФА. «Норм. фаг-пом.» – селекция с обычным фагом-помощником. «Мут. фаг-пом.» – селекция с мутантным фагом-помощником.

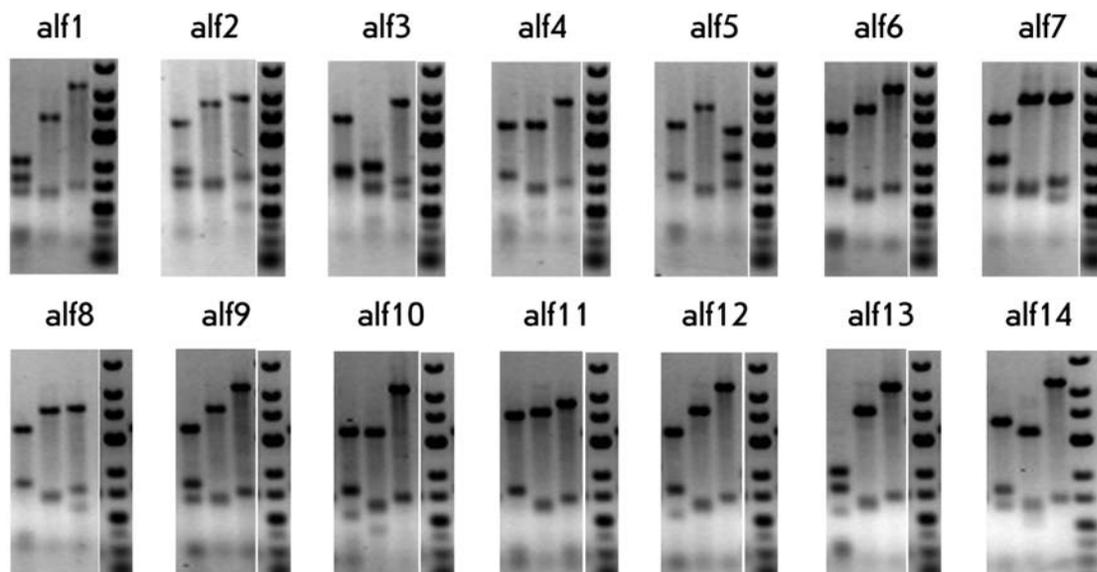


Рис. 2. НМР-фингерпринты отобранных клонов наноантител, связывающихся при иммуноферментном анализе с иммобилизованным препаратом летального фактора *Bacillus anthracis*. Эти клоны обозначены как «alf» с соответствующим порядковым номером.

фагмиды рНЕН4 в данной работе использованы прямой праймер RP (5'-cacacaggaacagctatgac-3') и обратный праймер GIII (5'-ccacagacagcctcatag-3'). После проведения ПЦР в объеме 20 мкл реакционную смесь равномерно распределяли по трем пробиркам (по 6 мкл), в которых затем параллельно (в объеме 15 мкл) расщепляли ПЦР-продукт одной из трех рестриктаз: HinfI (Fermentas, Литва), MspI (Fermentas, Литва) и RsaI (СибЭнзим, Россия). Три варианта гидролизата наносили в соседние ячейки 2.5–3% агарозного геля и подвергали электрофоретическому фракционированию. В качестве маркеров размера фрагментов ДНК использовали смесь «low range» фирмы «Fermentas». Электрофореграмма (три дорожки геля с ДНК после

обработки соответственно рестриктазами HinfI, MspI или RsaI плюс четвертая дорожка – с маркерными ДНК) – надежный опознавательный фингерпринт-подобный образ («фингерпринт») данного варианта клонированной в фагмиде рНЕН4 последовательности, кодирующей мини-антитело. Такой метод расширенного фингерпринтного анализа (способа идентификации отдельного варианта клонированной последовательности мини-антитела) мы назвали «НМР-анализом». Именно с помощью НМР-анализа мы исследовали результаты процедур селекции (отбираемые на разных стадиях клоны мини-антител).

На рис. 1 представлены данные НМР-анализа выборочных (предположительно, наиболее часто пред-

Таблица 2. Относительная представленность различных вариантов фингерпринтов отобранных клонов наноантител, узнающих препарат вируса бешенства (aRv), на различных этапах их селекции

Номер клона (aRv №)	2 этап Нормальный фаг-помощник	2 этап Мутантный фаг-помощник	3 этап Нормальный фаг-помощник	3 этап Мутантный фаг-помощник	ИФА-сигнал
1	0/67	3/45	1/30	2/58	+
2	7/67	1/45	5/30	2/58	+
3	13/67	0/45	8/30	11/58	++
4	0/67	0/45	2/30	0/58	+++
5	4/67	1/45	1/30	0/58	+
6	0/67	0/45	1/30	0/58	+
7	0/67	0/45	0/30	1/58	+++
8	2/67	0/45	0/30	0/58	+
9	1/67	1/45	0/30	0/58	+
10	1/67	0/45	0/30	0/58	+
11	1/67	0/45	0/30	0/58	++
12	2/67	0/45	0/30	0/58	+++
13	4/67	0/45	0/30	2/58	++
14	0/67	2/45	0/30	0/58	++
15	1/67	0/45	0/30	0/58	+
16	1/67	0/45	0/30	0/58	+++
17	3/67	1/45	2/30	1/58	++

ставленных) клонов исходной, полученной нами в результате иммунизации и последующего клонирования библиотеки мини-антител. Отобраны и проанализированы все 94 клона, выросшие при разведении 10^{-5} базовой библиотеки, исходно состоящей из двух подбиблиотек. Выявлено 85 различных фингерпринтов, и только 9 из них повторяются дважды (2х) в данной выборке, т.е. библиотека получилась на удивление весьма разнородная, без доминирования отдельных последовательностей. Основная часть фингерпринтов (61) соответствует клонам, в которых последовательности, кодирующие наноантитело, встраивали в вектор по сайтам PstI–NotI. Меньшая часть фингерпринтов (33), обозначенных латинской буквой N, соответствует клонам, в которых последовательности, кодирующие наноантитело, встраивали в вектор по сайтам NcoI–NotI. Подчеркнуты варианты очень похожих фингерпринтов, встретившихся в каждой из двух подбиблиотек. Из *рис. 1* видно, что параллельное использование трех рестриктаз вместо одной позволяет выявить различия в значительно большем числе клонов. Так, например, при использовании только HinfI мы не смогли бы различить следующие группы клонов: 1) 3, 38, 52, 53 и 66; 2) 55, 56N, 60N, 62N, 74 и 75N. Также существенно меньше вариантов можно различить, если применять только одну из двух других рестриктаз, MspI и RsaI.

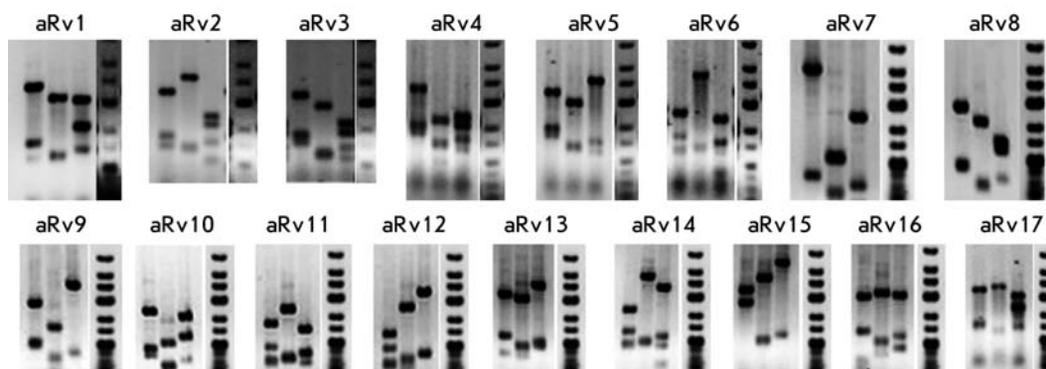
Полученный результат свидетельствует о достаточно большом разнообразии клонов в исходной библиотеке и о высокой разрешающей силе NMR-анализа. Следует заметить, что при использовании только одной рестриктазы (любой из трех – HinfI, MspI, RsaI) разнообразие фингерпринтов будет заметно меньшим и существенно менее надежным, поэ-

тому мы сочли принципиальным применение именно полной версии NMR-анализа и на всех последующих стадиях анализа отбираемых клонов мини-антител.

Алгоритм отбора наноантител был следующим. С помощью NMR-анализа анализировали выборку из наиболее представленных отбираемых клонов (всех клонов, вырастающих на чашке Петри при наибольшем разведении библиотеки или элюированных фаговых частиц, при котором вырастали по крайней мере 24 колонии). Все клоны с уникальным фингерпринтом использовали для наработки соответствующего наноантитела в периплазме бактерии хозяина. Периплазматические экстракты затем проверяли с помощью ИФА (ELISA) на наличие наноантитела, связывающего заданный антиген. В качестве антигенов для процедур селекции и ИФА применяли те же препараты вируса бешенства или летального фактора сибирской язвы, что и для иммунизации верблюда. Увеличение оптической плотности в ячейках иммунологической плашки отражало сумму двух процессов: степени экспрессии/доступности соответствующего наноантитела и силу его взаимодействия с иммобилизованным антигеном. На *рис. 2* и *3*, а также в соответствующих им *табл. 1* и *2* приведены данные о селекции именно финально отобранных искомым клонов наноантител, связывающих заданный антиген.

При обсуждении результатов следует аккуратно интерпретировать данные. Нельзя исключить возможность сходства фингерпринтов у некоторых различающихся по нуклеотидной и аминокислотной последовательности клонов, особенно при сравнении отобранных клонов со случайными клонами исходной библиотеки. Конечно же, более полную информацию дает секвенирование. Однако наш эксперименталь-

Рис. 3. НМР-фингерпринты отобранных клонов наноантител, связывающихся при иммуноферментном анализе с иммобилизованным препаратом вируса бешенства. Эти клоны обозначены как «aRv» с соответствующим порядковым номером.



ный опыт показывает, что в подавляющем числе случаев при идентификации клона НМР-анализ вполне может заменить секвенирование и на сегодняшний день представляется более экономичным методом.

НМР-анализ селекции наноантител, узнающих летальный фактор сибирской язвы

На рис. 2 представлены НМР-фингерпринты 14 вариантов отобранных клонов наноантител (alf), узнающих летальный фактор сибирской язвы. Только для пяти из них можно найти похожий фингерпринт среди 85 вариантов в исходной библиотеке: для alf3 – 68N, alf6 – 59, alf8 – 62N, alf9 – 58, alf10 – 64. Да и среди этих пяти вариантов сходство не обязательно означает идентичность. Так, вариант фингерпринта клона alf8 не выявлялся среди 28–30 проанализированных клонов после первого и второго раундов селекции, появлялся только после третьего раунда селекции и лишь в случае применения мутантного фага-помощника. С другой стороны, вариант фингерпринта клона alf6 вполне может соответствовать одному из наиболее представленных вариантов в исходной иммунной библиотеке наноантител, так как этот вариант остается наиболее представленным в ходе всех раундов селекции.

Здесь следует отметить один довольно неожиданный феномен, связанный с модифицированным методом селекции с использованием фага-помощника hrΔMBpIII.

При отборе наноантител к каждому из двух антигенов (табл. 1 и 2) в ходе первых двух этапов селекции заметно обогащались специфические варианты клонов, отличные как от тех 85, что представлены на рис. 1, так и от тех, которые обогащались при использовании традиционного фага-помощника. К сожалению, кодируемые этими клонами наноантитела в ИФА не связывали собственно заданные антигены. Эти клоны эффективно отсеивались на последующих этапах селекции. Мы предполагаем, что эти временно отбираемые клоны связываются с блокирующим агентом и впоследствии отсеиваются при его замене. По-

видимому, некоторые наноантитела, более доступные на поверхности мутантного фага, могут связываться или с компонентом обезжиренного молока (на первом этапе селекции), или с БСА (во время второго этапа селекции). На третьем же этапе, когда для блокировки снова использовали обезжиренное молоко, при селекции с мутантным фагом происходило резкое «прочищение» неспецифического фона. Исчезали неспецифические клоны, обогащавшиеся на первом и втором этапах селекции, и проявлялись фингерпринты специфических искомым клонов, многие из которых были идентичны клонам, отбираемым параллельно традиционным методом (табл. 1, клоны alf1, alf3, alf6, alf9, alf10, alf12, alf13, alf14). Любопытно, что, как и в предыдущей нашей работе [11], некоторые варианты наноантител удалось отобрать только с помощью модифицированной процедуры селекции (табл. 1, клоны alf5, alf7, alf8, alf11). Есть и варианты, отбираемые только с помощью традиционной процедуры (alf2-клон после второго этапа селекции, alf4). Интересно, что клоны наноантител, дающие наибольший сигнал в ИФА, не обязательно наиболее представлены среди отбираемых клонов и могут даже теряться в ходе последующих раундов селекции (alf2). Особенно сильно после трех раундов селекции обогащались клоны, дающие в ИФА сигнал средней силы.

НМР-анализ селекции наноантител, узнающих препарат вируса бешенства

Любопытно, что сделанные выше заключения подтвердились и при селекции наноантител (aRv), узнающих препарат вируса бешенства (рис. 3, табл. 2).

В этом случае также только для пяти из 17 финально отобранных клонов можно найти похожий фингерпринт среди 85 вариантов в исходной библиотеке: для aRv2 – 32, aRv3 – 12N, aRv5 – 75N, aRv13 – 76N, aRv17 – 46N. Вариант фингерпринта клона aRv3 вполне может соответствовать одному из наиболее представленных вариантов в исходной иммунной библиотеке наноантител, так как этот вариант остается также наиболее представленным в ходе всех раундов селек-

ции с нормальным фагом-помощником. Анализ селекции этого фингерпринтного варианта при использовании мутантного фага-помощника позволяет особенно четко увидеть тот же, что и в предыдущем случае, эффект «прочищения неспецифического фона» в результате трех раундов селекции с изменением блокирующего агента. Как в рассмотренном ранее случае отбора наноантител, узнающих летальный фактор сибирской язвы, так и в данном случае параллельное использование традиционного и модифицированного методов селекции (разных фагов-помощников) позволяет отобрать большее разнообразие клонов наноантител. Так, только при традиционной селекции отобраны варианты фингерпринтов, соответствующих клонам aRv4, aRv6, aRv8, aRv10, aRv11, aRv12, aRv15 и aRv16. И только при использовании модифицированной процедуры отобраны варианты aRv7, aRv13 и aRv14. Вариант aRv13 был отобран и с помощью традиционной процедуры в результате двух этапов селекции, но затем утерян в ходе третьего этапа.

Интересно, что и в этом случае клоны наноантител, дающих наибольший сигнал в ИФА, не принадлежали к наиболее представленным среди отобранных клонов. Клоны aRv4, aRv7, aRv12 и aRv16 были отобраны в небольшом числе и только одним из двух методов селекции. При переходе от второго к третьему этапу селекции некоторые из этих клонов (aRv12, aRv16) легко могут быть утеряны.

ВЫВОДЫ

Для повышения эффективности селекции наноантител с заданной специфичностью, основанной на методе фагового дисплея, можно рекомендовать применение параллельной селекции с использованием как традиционного фага-помощника, так и модифицированного фага-помощника с N-концевой делецией в поверхностном белке gIII. В модифицированной процедуре

следует учитывать более высокий неспецифический фон, который, по-видимому, связан с отбором фаговых частиц, содержащих наноантитела, связывающиеся с блокирующим агентом или иным неспецифическим компонентом в иммунологической плашке. Нельзя исключить и специфического связывания с антигеном, которое происходит только когда наноантитело экспонировано на поверхности фага и пропадает при переходе к собственно свободному наноантителу. Последовательное применение различных блокирующих агентов позволяет в ходе трех раундов селекции сильно уменьшить неспецифический фон в случае использования предложенного мутантного фага-помощника. Следует учитывать тот факт, что искомые наноантитела с особо привлекательными характеристиками могут теряться на дополнительных этапах амплификации/селекции. Мы можем рекомендовать проводить анализ отбираемых клонов после второго и третьего этапов селекции в традиционной методике и сразу после третьего этапа селекции в случае модифицированного метода. По нашим данным хорошие результаты дает также использование модифицированного метода после начального традиционного этапа селекции. ●

Работа поддержана Министерством образования и науки РФ (ГК № 02.512.11.2320), а также Программой Президиума РАН № 27 «Основы фундаментальных исследований нанотехнологий и наноматериалов» (3.1.2.). Авторы благодарны проф. С. Муилдермансу (S. Muyltermans, Vrije Universiteit Brussel, Belgium) за предоставление фагмиды pHEN4 и штаммов E. coli TG1 и WK6, а также М.В. Рutowской и сотрудникам научно-экспериментальной базы «Черноголовка» ИПЭЭ имени А.Н. Северцова РАН за помощь в содержании и иммунизации верблюда.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brissette R., Goldstein N.I. // *Methods Mol. Biol.* 2007. V. 383. P. 203–213.
2. Sidhu S.S., Koide S. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2007. V. 17. № 4. P. 481–487.
3. Hoogenboom H.R. // *Nat. Biotechnol.* 2005. V. 23. № 9. P. 1105–1116.
4. Hamers-Casterman C., Atarhouch T., Muyltermans S., et al. // *Nature.* 1993. V. 363. P. 446–448.
5. Ghassabeh G.H., Muyltermans S., Saerens D. // *Current Trends in Monoclonal Antibody Development and Manufacturing* / Eds Shire S.J., et al. New York: Springer, 2010. P. 29–48.
6. Деев С.М., Лебедев Е.Н. // *Acta Naturae.* 2009. T. 1. № 1. P. 32–50.
7. Vincke C., Loris R., Saerens D., et al. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. № 5. P. 3273–3284.
8. Wesolowski J., Alzogaray V., Reyelt J., et al. // *Med. Microbiol. Immunol.* 2009. P. 157–174.
9. Muyltermans S., Baral T.N., Retamozzo V.C., et al. // *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2009. V. 128. P. 178–183.
10. Вятчанин А.С., Тиллиб С.В. // *Биотехнология.* 2008. № 4. С. 32–34.
11. Ghahroudi M.A., Desmyter A., Wyns L., et al. // *FEBS Lett.* 1997. V. 414. P. 521–526.
12. Nguyen V.K., Desmyter A., Muyltermans S. // *Adv. Immunol.* 2001. V. 79. P. 261–296.
13. Conrath K.E., Lauwereys M., Galleni M., et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001. V. 45. P. 2807–2812.
14. Saerens D., Kinne J., Bosmans E., et al. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 51965–51972.
15. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Edn. 2. Cold Spring Harbor, N.Y.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
16. Barbas III C.F., Burton D.R., Scott J.K., Silverman G.J. *Phage Display: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, N.Y.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
17. Zell R., Fritz H.J. // *EMBO J.* 1987. V. 6. P. 1809–1815.
18. Vieira J., Messing J. // *Methods Enzymol.* 1987. V. 153. P. 3–11.

УДК 577.352.465

Регуляция депо-управляемых кальциевых каналов белками семейства Homer в клетках A431

А. В. Шалыгин¹, М. А. Рязанцева¹, Л. Н. Глушанкова¹, И. Б. Безпрозванный², Г. Н. Можяева¹, Е. В. Казначеева^{1*}

¹ Учреждение Российской академии наук Институт цитологии РАН, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий просп., 4, Россия

² Юго-Западный медицинский центр Техасского университета, 75235, Даллас, США

*E-mail: evkzn@hotmail.com

Поступила в редакцию 29.08.2010 г.

РЕФЕРАТ Адаптерные белки семейства Homer играют важную роль в кальциевой сигнализации в различных типах клеток. В данной работе в экспериментах по регистрации одиночных каналов на изолированных фрагментах плазматической мембраны (inside-out) разобщение белков Homer с их белками-мишенями специфически активировало каналы I_{\min} , но не каналы I_{\max} . В аналогичных условиях инозитол-1,4,5-трисфосфат может активировать оба типа каналов. Короткие (1a) и длинные (1c) изоформы белков Homer по-разному влияют на каналы I_{\min} . Белок Homer 1a, в отличие от белка Homer 1c, активировал каналы I_{\min} . Таким образом, нами показано, что в клетках A431 депо-управляемые каналы I_{\min} регулируются белками Homer.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА депо-управляемые каналы, Homer, A431, IP_3R , кальциевая сигнализация.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ SOC – депо-управляемые каналы (store-operated channels); mGluR – метаботропный глутаматный рецептор; IP_3 – инозитол-1,4,5-трисфосфат; IP_3R – рецептор инозитол-1,4,5-трисфосфата; RyR – рианодинный рецептор; UTP – уридинтрифосфат; GST – глутатион-S-трансфераза.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время большое внимание уделяется исследованиям кальциевой сигнализации в электронеозбудимых клетках, так как изменения концентрации Ca^{2+} в цитоплазме регулируют огромное количество внутриклеточных процессов. Концентрация Ca^{2+} в цитоплазме может увеличиться как за счет выброса Ca^{2+} из внутриклеточных кальциевых депо, так и за счет входа Ca^{2+} из внеклеточной среды. В электронеозбудимых клетках вход Ca^{2+} в основном происходит через депо-управляемые каналы (store-operated channels, SOC) [1]. Депо-управляемые каналы активируются в ответ на опустошение кальциевых депо. В разных тканях были описаны депо-управляемые каналы с различными биофизическими характеристиками, что предполагает различный молекулярный состав таких каналов [1]. Несмотря на то что основные белки, участвующие в депо-управляемом входе Ca^{2+} , известны, непонятным остается механизм колокализации этих белков.

В нервных клетках описаны адаптерные белки семейства Homer, которые связывают в единый макромолекулярный комплекс метаботропный глутаматный рецептор (mGluR) плазматической мембраны с

рецептором инозитол-1,4,5-трисфосфата (IP_3R) эндоплазматического ретикулума [2]. Позже было показано, что Homer может взаимодействовать с белками TRPC [3, 4], кальциевой АТФазой, рианодинным рецептором (RyR) и другими белками [5]. Более того, в нервных клетках адаптерные белки Homer и Shank образуют сетеподобную структуру, которая организует постсинаптические белки [6]. На N-конце белков Homer расположен домен EVH1, позволяющий им узнавать свои мишени, а именно аминокислотную последовательность PPXXF (пролин, пролин, две любые аминокислоты, фенилаланин). Существуют длинные и короткие изоформы белков Homer (рис. 1A). Длинная изоформа на C-конце имеет домен coil-coiled, позволяющий образовывать олигомеры. У короткой изоформы, образующейся при альтернативном сплайсинге, этот домен отсутствует [5]. Длинные изоформы образуют тетрамеры с параллельной укладкой C-концов и четырьмя доменами EVH1; такая структура позволяет им колокализовать белки кальциевой сигнализации [7]. Поскольку короткие изоформы не могут олигомеризоваться, то они являются негативными регуляторами функции длинных Homer. Также было показано, что Homer не только

регулирует колокализацию белков, но и может модулировать активность mGluR [8], ионных каналов RyR [9] и TRPC [3, 4].

Было выдвинуто предположение, что белки Homer могут участвовать и в регуляции SOC. Предыдущие исследования, подтверждающие эту гипотезу, проводились с помощью техники patch clamp в конфигурации whole-cell или флуоресцентных измерений внутриклеточной концентрации кальция [3, 4]. Однако эти методы позволяют оценить лишь суммарный вход кальция в клетку. Поскольку в клетках сосуществуют различные типы депо-управляемых кальциевых каналов, то оставалось неизвестным, какие конкретно типы депо-управляемых каналов регулируются белками семейства Homer. Цель настоящей работы заключалась в исследовании роли белков семейства Homer в регуляции депо-управляемых кальциевых каналов в клетках A431.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клетки

Клетки эпидермоидной карциномы человека A431 (из коллекции клеточных культур Института цитологии РАН) культивировали в среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и антибиотиков (100 мкг/мл пенициллина, 100 ед./мл стрептомицина). За 2–4 сут до начала эксперимента клетки высевали на фрагменты покровных стекол (3 × 3 мм).

Материалы

Для культивирования клеток использовали среду DMEM (ICN), сыворотку крови эмбрионов телят (FCS, GIBCO BRL, США), сыворотку крови эмбрионов крупного рогатого скота (FBS, GIBCO BRL, США), генетицин G-418 (Geneticin, GIBCO BRL, США). В работе также применяли глутатион-сефарозу (Pharmacia, Швеция); 1,5-изопропилтио-β-D-галактозид (1,5 isopropylthio-β-D galactoside, IPTG, Pharmacia, Швеция); инозитол-1,4,5-трисфосфат (IP₃) (LC Laboratories, США); уридинтрифосфат (UTP, Calbiochem, Германия); HEPES, Тритон X-100 (Sigma, США), EGTA (Fluka, Швейцария); антитела к GST (Sigma, США), вторичные антитела (кроличьи и мышиные) (Sigma, США); антитела к Homer 1bc (Santa Cruz, США). Поликлональные антитела (pAb) к IP₃R первого типа T443 были описаны ранее [10]. Синтез пептидов РРККFR и РРККRR был заказан в фирме «Диафарм» (Россия).

Метод локальной фиксации потенциала (patch clamp)

Во всех экспериментах потенциал внеклеточного раствора принимали за нулевой.

В конфигурации inside-out внутриклеточный раствор (камера) содержал (в mM): 140 К-глутамат, 5 NaCl, 1 MgCl₂, 10 HEPES-K, pH 7.4, 2 EGTA-K и 1.13 CaCl₂ (pCa 7). Раствор пипетки содержал (в mM): 105 BaCl₂, 10 Tris-HCl (pH 7.3). Присутствие ионов Ba²⁺ способствовало предотвращению активации кальцийзависимых и блокированию потенциалзависимых калиевых каналов. Электрическое сопротивление заполненных раствором пипеток составляло 8–20 МОм.

В конфигурации whole-cell внутривнутриклеточный раствор содержал (в mM): 145 NMDG аспартата, 10 Cs-EGTA, 10 Cs-HEPES, pH 7.3, 1.5 MgCl₂ и 4.5 CaCl₂ (pCa 7.0). Внеклеточный раствор содержал (в mM): 140 NMDG аспартата, 10 BaCl₂, 10 Cs-HEPES, pH 7.3. Для конфигурации whole-cell вытягивались пипетки, сопротивление которых после оплавления составляло 3–5 МОм. Во всех опытах whole-cell на мембране поддерживался потенциал, равный 0 мВ. С периодом в 5 с управляющий потенциал менялся по следующей схеме. Сначала подавался потенциал -100 мВ в течение 60 мс, затем следовало пилообразное изменение потенциала (voltage ramp) от -100 до 100 мВ в течение 600 мс, после чего потенциал возвращался к 0 мВ. Токи whole-cell нормализовались относительно емкости клетки, которая отражает клеточный размер. Среднее значение клеточной емкости составляло 21 ± 4 пФ (общее число опытов $n = 25$).

Регистрацию токов проводили с помощью усилителя Axopatch 200B (Axon Instruments, США). Сигнал оцифровывали на частоте 5000 Гц с помощью платы АЦП L 305 (L-Card, Россия). Для анализа и представления данных по измерениям токов одиночных каналов низкой проводимости осуществляли дополнительную фильтрацию (80–100 Гц). Амплитуды токов одиночных каналов определяли по записям токов и по амплитудным гистограммам. Для количественной оценки степени активности каналов использовали величину NP_0 , т.е. произведение количества проводящих каналов (N) в данном фрагменте записи на величину вероятности открытого состояния (P_0), которая определялась из соотношения $P_0 = I/Ni$, где I – среднее значение тока через мембранный фрагмент на данном временном интервале, i – амплитуда тока открытого канала.

Для оцифровки и анализа записей использовали программное обеспечение, написанное В.А. Алексеенко, и пакеты программ pClamp 6.0.4, Microcal Origin 6.0, Microsoft Excel.

Электрофорез и иммуноблоттинг (ИБ)

Белковые пробы разделялись с помощью электрофореза в 8% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. Гель либо окрашивали Кумасси, либо

переносили белки из него на мембрану, которую проявляли с помощью специфических антител на интересующие нас белки.

Экспрессия и очистка рекомбинантных белков GST-Homer 1c и GST-Homer 1a

Клетки *Escherichia coli* BL-21(DE3) трансформировали плазмидами pGEX-2T-Homer1A и pGEX-2T-Homer1C (любезно предоставленными М.М. Соловьевым из университета Оксфорда, Великобритания). Экспрессию рекомбинантных белков индуцировали 1 mM IPTG. Затем бактерии разрушали и очищали химерные белки GST-Homer на глутатион-сефарозе. Полученные белки хранили при 4°C. Степень очистки белка проверяли с помощью электрофореза и иммуноблоттинга с использованием поликлональных антител к GST и Homer.

Клеточный лизат

Клетки A431 в чашке диаметром 10 см лизировали в течение 10 мин при 4°C в 1 мл раствора, содержащего 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Тритон X-100, 0.5% NP40, 10% глицерин, 0.5 mM PMSF, с добавлением коктейля ингибиторов протеиназ (PIC, Hoffmann-La Roche AG, Швейцария). Лизат трижды пропускали через шприц, затем центрифугировали с ускорением 22000 g при 4°C в течение 30 мин и отбирали супернатант, который впоследствии использовали в опытах.

Эксперименты pull-down (PD)

К 25 мкл глутатион-сефарозы со связанными на ней химерными белками GST-Homer добавляли лизаты клеток A431 и инкубировали на переворотном шейкере при 4°C в течение 12–24 ч. Реакцию проводили в буфере PBS с 1% Тритоном X-100. В ряде экспериментов инкубацию проводили в присутствии IP_3 . После этого сефарозу промывали 3 раза по 1 мл PBS с 1% Тритоном X-100 (на сефарозе оставался белок GST-Homer и связавшиеся с ним белки). Наличие IP_3R в пробах проверяли методом иммуноблоттинга с использованием поликлональных антител к IP_3R .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разобщение белков Homer с белками-мишенями, вызванное пептидом PPKKFR, активирует вход кальция в клетках A431

Результаты иммуноблоттинга показали, что в клетках A431 экспрессируются длинные изоформы белков Homer (рис. 1Б). Домен EVH1 белков Homer узнает в белках-мишенях аминокислотную последовательность PPKKFR, где X – любая аминокислота (рис. 1А) [2]. Чтобы определить роль адаптерных

белков семейства Homer в регуляции кальциевых рецептор- или депо-управляемых каналов, мы использовали синтетический пептид PPKKFR. Ранее было показано, что аналогичный пептид вызывает диссоциацию комплекса, образованного белком Homer с метаботропным глутаматным рецептором [2].

В контрольных экспериментах мы использовали пептид PPKKRR, где замена фенилаланина на аргинин отменяла узнавание пептида доменом EVH1. Для выяснения роли белков Homer в регуляции входа кальция в клетки A431 мы использовали метод локальной фиксации потенциала в конфигурации whole-cell. Интегральный вход Ca^{2+} , регистрируемый в условиях внутриклеточного диализа PPKKFR- или PPKKRR-содержащими растворами, сравнивали с интегральным депо-управляемым входом кальция, активированным уридинтрифосфатом.

Внутриклеточный диализ раствором, содержащим 1 мкМ PPKKFR, приводил к активации селективного кальциевого тока со средней максимальной амплитудой в 1.3 ± 0.1 пА/пФ ($n = 5$) (рис. 2А). Если раствор в пипетке содержал пептид PPKKRR, ток не развивался ($n = 10$). Последующее добавление 100 мкМ УТР к таким клеткам приводило к развитию тока ($n = 5$) (рис. 2А). Амплитуда тока, вызванного УТР, составля-

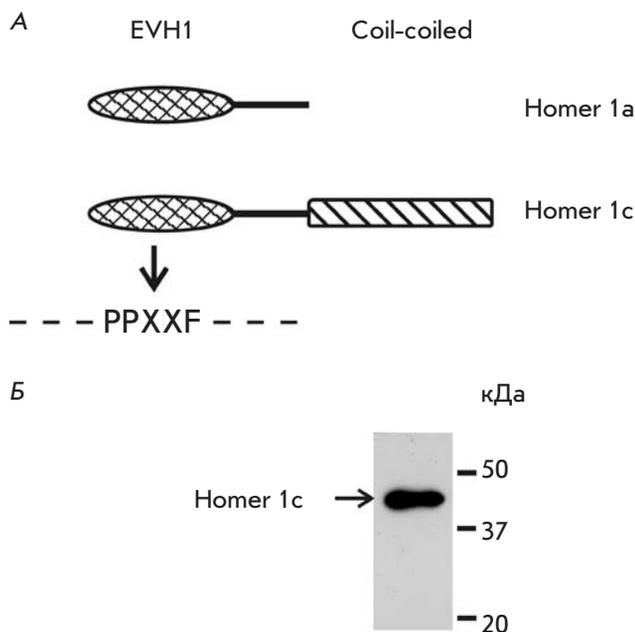


Рис. 1. В клетках A431 экспрессируются длинные изоформы белков семейства Homer. А – Схема структуры белков семейства Homer. Б – Иммуноблоттинг лизата клеток A431, проявленный моноклональными антителами к Homer 1bc. Справа отмечены положения молекулярных маркеров.

ла в среднем 1.8 ± 0.3 пА/пФ, то есть была больше, чем амплитуда тока, активированного пептидом РРККFR (рис. 2Б). Потенциал реверсии токов, активированных пептидом РРККFR, был выше, чем у токов в ответ на УТР. Таким образом, каналы, активированные пептидом РРККFR, были селективнее для ионов Ca^{2+} , чем каналы, активированные УТР (рис. 2Б).

Полученные нами данные согласуются с опубликованными ранее работами других авторов, предположивших взаимосвязь между белками Homer и депо-управляемым входом Ca^{2+} в электронеозбудимые клетки [3, 4].

Ранее в клетках А431 нами было описано несколько типов чувствительных к УТР кальциевых каналов, токи через которые имели разный потенциал реверсии [11]. Мы предположили, что различия в амплиту-

де токов и селективности каналов в ответ на пептид РРККFR и на УТР связаны с тем, что стимуляция клеток УТР активирует несколько типов кальциевых каналов, тогда как пептид РРККFR активирует не все типы каналов.

К отделению белков Homer от белков-мишеней, вызванному пептидом РРККFR, чувствительны каналы I_{\min} , но не каналы I_{\max}

Чтобы исследовать, какие кальциевые каналы, экспрессируемые в клетках А431, ответственны за токи, активируемые диссоциацией комплекса, образованного Homer с белками-мишенями, мы поставили эксперименты в конфигурации inside-out. В экспериментах inside-out на клетках А431 встречаются два типа депо-управляемых каналов: I_{\min} и I_{\max} [11]. Электрофизиологические характеристики этих каналов различны, что позволяет легко идентифицировать их по экспериментальным записям токов. Каналы I_{\min} обладают малой проводимостью (1.2 пСм) и высокой селективностью для двухвалентных катионов. Каналы I_{\max} обладают большей, чем I_{\min} , проводимостью (18 пСм), но при этом их селективность меньше.

В конфигурации inside-out добавление 100 нМ пептида РРККFR с цитоплазматической стороны мембранного фрагмента приводило к активации входящего тока (рис. 3А). Оказалось, что основные электрофизиологические свойства активируемых каналов (кинетика работы, проводимость и потенциал реверсии) совпадают с характеристиками каналов I_{\min} , описанными нами ранее [11–18]. Этот факт позволяет сделать вывод о том, что разъединение белков Homer с белками-мишенями, вызванное пептидом РРККFR, приводит к активации каналов I_{\min} в клетках А431, что согласуется с полученными ранее в нашей лаборатории данными на клетках НЕК293 [12]. Каналы I_{\min} активировались пептидом РРККFR в 43% случаев ($n = 60$) (рис. 3А). Контрольный пептид РРККRR (не приводящий к отделению молекул Homer от мишеней) не активировал каналы ни в одном из 36 опытов, причем последующее добавление РРККFR в том же эксперименте активировало каналы I_{\min} в 42% опытов ($n = 26$) (рис. 3Б). Пептид РРККFR не вызывал активацию каналов I_{\max} – другого типа депо-управляемых каналов в клетках А431 ($n = 60$).

В аналогичных экспериментах добавление 2.5 мкМ инозитол-1,4,5-трисфосфата (IP_3) с цитоплазматической стороны мембраны в экспериментах inside-out активировало каналы I_{\min} в 32% и каналы I_{\max} в 8% опытов ($n = 80$) (рис. 3В, Г), что согласуется с нашими предыдущими результатами [11]. При потенциале в -70 мВ амплитуды токов через каналы I_{\min} составляли 0.18 пА, тогда как амплитуды токов через каналы I_{\max} составляли 1.7 пА (рис. 3А–Г).

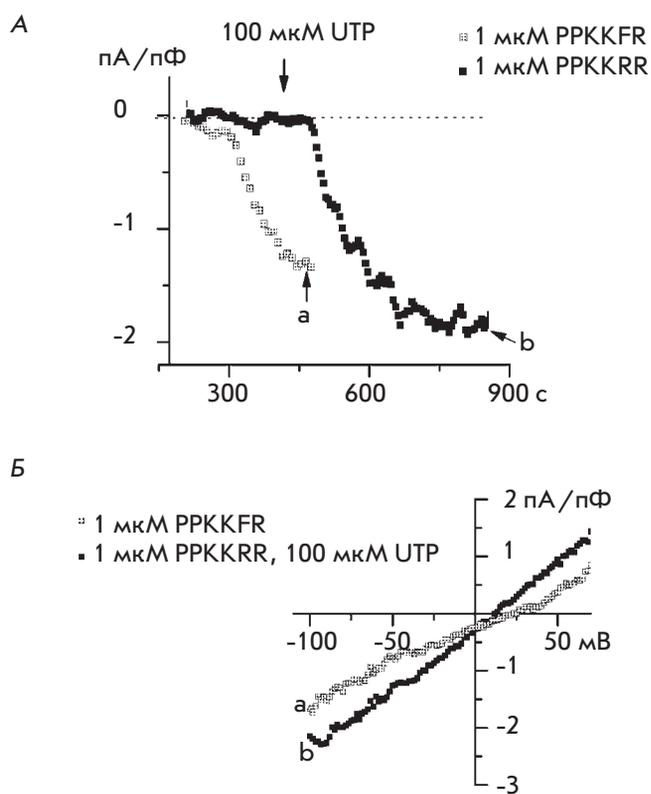


Рис. 2. Записи токов, индуцированных пептидами РРККFR или РРККRR в экспериментах whole-cell. А – Развитие во времени токов при потенциале -80 мВ, в присутствии пептида РРККFR (серые квадраты) или РРККRR (черные квадраты) в регистрирующей пипетке. Момент добавления УТР отмечен стрелкой сверху. Стрелками а и б отмечены максимальные значения токов. Б – Усредненные вольт-амперные характеристики токов, индуцированных пептидом РРККFR или УТР. Усреднение проводилось для максимального значения токов whole-cell, которые отмечены стрелками а и б на панели А.

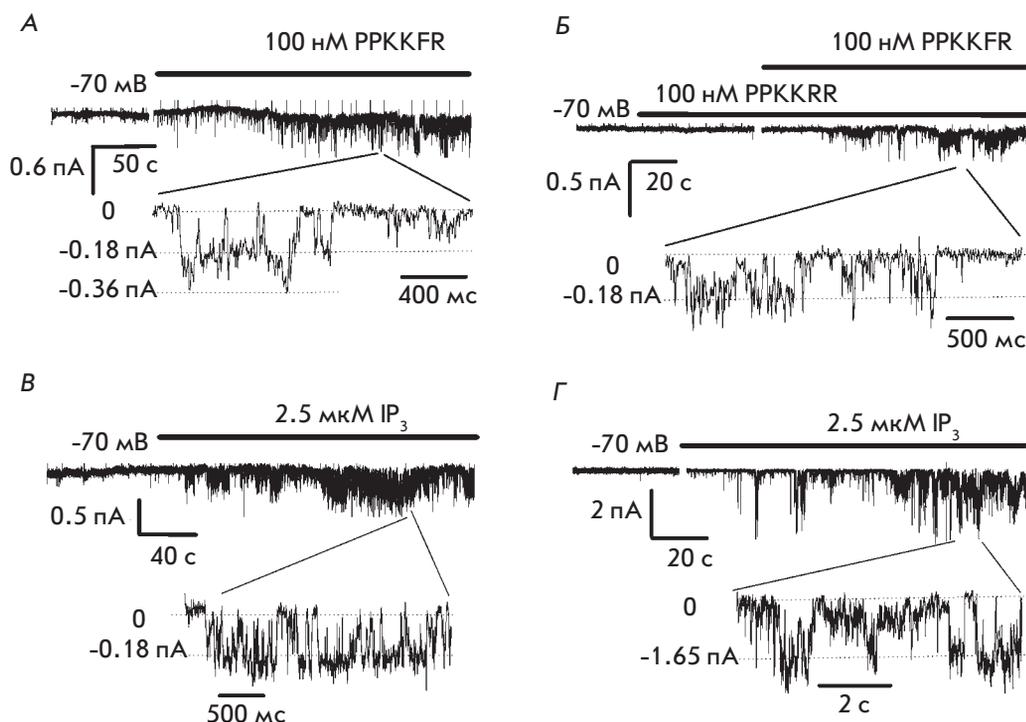


Рис. 3. Пептид PPKKFR активирует каналы I_{\min} , но не I_{\max} . А – Добавление 100 нМ PPKKFR с цитоплазматической стороны мембранного фрагмента (конфигурация inside-out, потенциал на мембране -70 мВ) приводит к активации каналов I_{\min} . Внизу показан фрагмент записи тока в развернутом временном масштабе. Б – Добавление 100 нМ контрольного пептида PPKKRR не активирует токи, тогда как последующее добавление 100 нМ пептида PPKKFR активирует каналы I_{\min} . В, Г – Добавление 2.5 мкМ IP_3 активирует каналы I_{\min} (В) и каналы I_{\max} (Г). Примеры записей токов через одиночные каналы на изолированном фрагменте мембраны при потенциале, равном -70 мВ.

Таким образом, нарушение связи белков Homer с белками-мишенями, вызванное пептидом PPKKFR, приводит к активации каналов I_{\min} , тогда как каналы I_{\max} в клетках A431 не чувствительны к этому пептиду. Мы не знаем, регулируются ли белками Homer два других типа депо-управляемых каналов клеток A431 – I_{NS} и I_{CRAC} , поскольку эти каналы не встречаются (или не различимы) в конфигурации inside-out.

Данные по регистрации активности одиночных каналов хорошо согласуются с результатами экспериментов whole-cell. Поскольку UTP активирует все типы депо-управляемых каналов у клеток A431, а пептид PPKKFR не активирует по крайней мере каналы I_{\max} , это означает, что пептид вызывает частичную активацию кальциевых каналов в конфигурации whole-cell. Этот факт объясняет разницу в величинах зарегистрированных интегральных токов. Поскольку каналы I_{\max} менее селективны, чем каналы I_{\min} , то UTP-вызванный интегральный ток проявляет меньшую селективность.

Каналы I_{\min} активируются изоформой Homer 1a, но не Homer 1c

Среди белков Homer есть две принципиально разные группы [5]. У длинных изоформ белка (таких, как Homer 1c) на С-конце находится домен coil-coiled, который позволяет им образовывать гомоолигомеры. Отсутствие домена coil-coiled у коротких изоформ (таких, как Homer 1a) не позволяет им формировать олигомерные комплексы (рис. 1А). Чтобы исследовать действие коротких и длинных изоформ на активность депо-управляемых каналов в A431, мы использовали

рекомбинантные белки Homer, полученные из бактерий *E. coli*, трансформированных плазмидой GST-Homer. Функциональную активность выделенных таким образом белков Homer 1a и Homer 1c мы проверяли по их способности связывать IP_3R1 в экспериментах pull-down.

Мономерная изоформа белков Homer 1a в концентрации 100 нМ активировала кальциевые каналы в 30% экспериментов inside-out ($n = 101$) (рис. 4А). Вольт-амперная характеристика каналов, активированных белком Homer 1a, совпадала с вольт-амперной характеристикой каналов I_{\min} , активированных UTP, опустошением депо или IP_3 в клетках A431 или НЕК293 [11, 13–18]. Проводимость каналов, активированных белком Homer 1a, составила 1.3 пСм. Длинная изоформа Homer 1c в концентрации 100 нМ не активировала каналы ($n = 58$), в то время как последующее добавление Homer 1a приводило к активации каналов I_{\min} в 27% экспериментов ($n = 44$) (рис. 4Б). Ни Homer 1a, ни Homer 1c не активировали каналы I_{\max} .

Из полученных данных можно сделать вывод о том, что разные изоформы Homer неодинаково действуют на каналы I_{\min} в A431, причем мономерные белки Homer 1a активируют, а длинные изоформы Homer 1c не активируют каналы. Аналогичное действие различные изоформы белков Homer оказывают на mGluR [8] и каналы TRPC [3, 4], но не на каналы RyR [19, 20], которые активируются как длинными, так и короткими изоформами Homer, причем длинные изоформы активируют RyR первого типа даже сильнее, чем короткие изоформы.

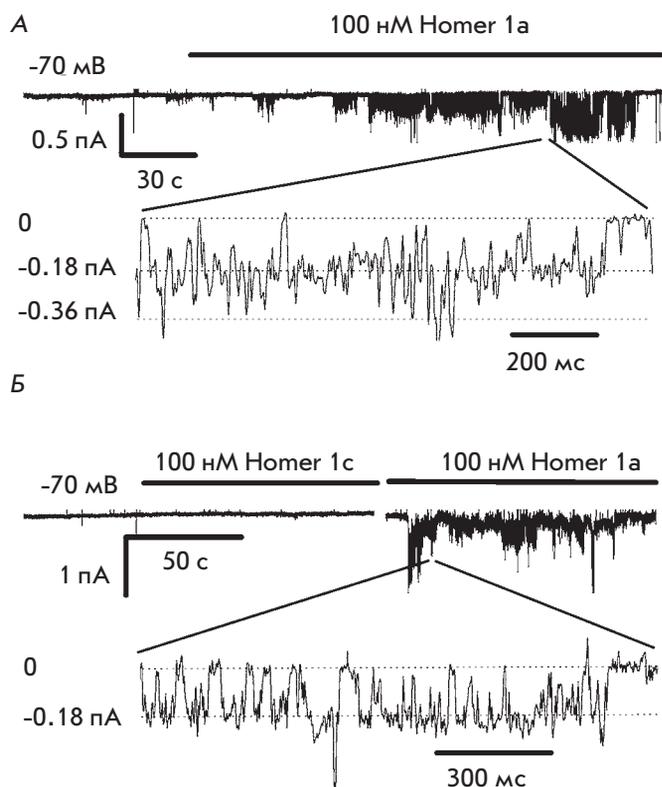


Рис. 4. Белок Homer 1a активирует каналы I_{\min} . А – Добавление 100 нМ белка Homer 1a с цитоплазматической стороны мембранного фрагмента (конфигурация inside-out, потенциал на мембране -70 мВ) приводит к активации каналов I_{\min} . Внизу представлена запись тока в расширенном масштабе времени. Б – 100 нМ Homer 1c не активирует каналы, тогда как последующее добавление 100 нМ Homer 1a активирует каналы I_{\min} . Внизу представлена запись тока в расширенном масштабе времени.

Для TRPC было предложено следующее объяснение действия белков Homer, которое, по-видимому, подходит и для каналов I_{\min} . Поскольку белки Homer 1c могут формировать олигомеры, а короткие изоформы Homer 1a, у которых нет coil-coiled-домена, не могут, было выдвинуто предположение, что олигомерные комплексы блокируют активность каналов, а активирует каналы разобщение с олигомерами Homer [3, 4]. Наши электрофизиологические эксперименты с пептидами и рекомбинантными белками показывают, что не белок Homer 1a сам по себе, а именно нарушение взаимодействия олигомерных комплексов Homer с белками-мишенями необходимо для активации каналов I_{\min} . Можно предположить, что при отделении олигомерных комплексов Homer меняется характер взаимодействия между кальциевым каналом и другими белками, в том числе IP_3R . Такое разобщение может вызываться пептидом PPKKFR, короткой изоформой Homer 1a или IP_3 (см. ниже). Известно, что белки Homer 1 не влияют

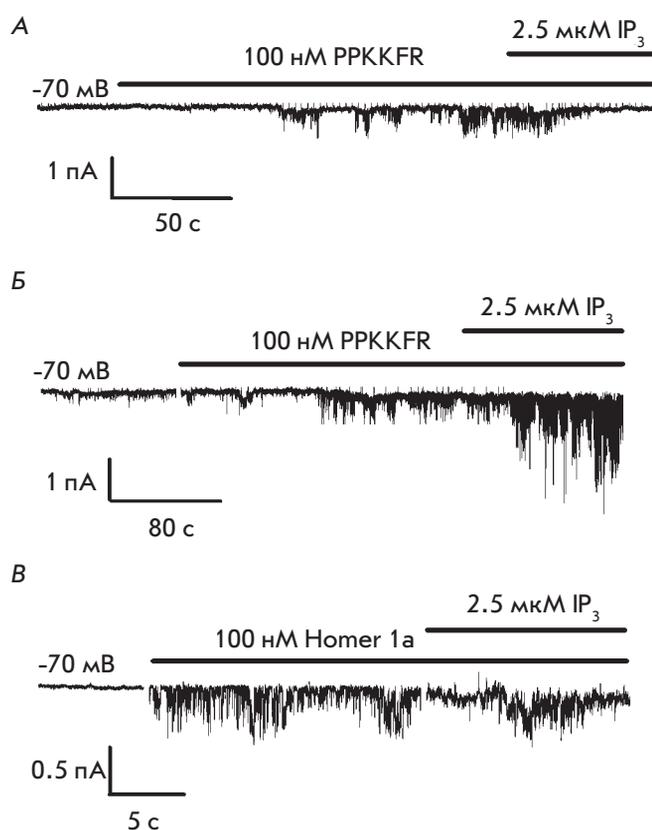


Рис. 5. Отщепление нативных белков Homer и действие IP_3 не аддитивны при активации каналов I_{\min} . А – Активность каналов I_{\min} , вызванная 100 нМ PPKKFR, не увеличивается при последующем добавлении 2.5 мкМ IP_3 . Б – Приложение 100 нМ PPKKFR с цитоплазматической стороны мембраны активирует каналы I_{\min} . Последующее добавление 2.5 мкМ IP_3 вызывает активность каналов I_{\min} . В – Активность каналов I_{\min} , вызванная 100 нМ Homer 1a, не меняется при добавлении 2.5 мкМ IP_3 .

на метаболизм фосфоинозитидов, в частности не вызывают увеличение концентрации IP_3 и не могут вызывать выброса из IP_3 чувствительных кальциевых депо [21]. Таким образом, можно утверждать, что Homer активирует депо-управляемые каналы за счет непосредственного воздействия на канал плазматической мембраны, но не за счет дополнительного выброса из кальциевых депо. Следовательно, несмотря на то, что каналы I_{\min} являются депо-управляемыми в клетках A431, они, по-видимому, могут функционировать и по депо-нечувствительному механизму – в случае, когда они активируются при диссоциации комплекса, образованного белками Homer с белками-мишенями.

Воздействие IP_3 и разобщение нативных белков Homer с белками-мишенями влияют на работу каналов I_{\min} не аддитивно

Поскольку каналы I_{\min} регулируются как IP_3 , так и белками Homer, то возникает вопрос, адди-

тивно ли их действие на эти каналы. Добавление 2.5 мкМ IP_3 к мембранным фрагментам с РРККFR-индуцированной активностью обычно не приводило к дальнейшему увеличению активности каналов (10 из 13 опытов) (рис. 5А). В аналогичных экспериментах с рекомбинантным белком Номер 1а аппликация IP_3 также не изменяла активность каналов (рис. 5В). Однако в нескольких опытах добавление IP_3 активировало каналы I_{max} (рис. 5Б). В экспериментах, где пептид РРККFR или рекомбинантный белок Номер 1а не вызывал активность каналов I_{min} , IP_3 также не активировал каналы. Таким образом, мы показали, что отщепление нативных белков Номер и действие IP_3 не аддитивны. Эти данные позволяют предположить, что каналы I_{min} регулируются IP_3 и белками Номер по одному сигнальному пути.

IP_3 нарушает взаимодействие белков Номер с IP_3R1

В клетках А431 в основном экспрессируется IP_3R первого типа (Глушанкова, неопубликованные данные). Как сообщалось ранее, в этих клетках каналы I_{min} , по-видимому, регулируются конформационным сопряжением с IP_3R первого типа [15, 17]. В нашей работе мы показали, что белки Номер участвуют в регуляции I_{min} . Данные рентгеноструктурного анализа IP_3R указывают на близкое пространственное расположение мотива, узнаваемого белками Номер, и домена, связывающего IP_3 [22]. Также было показано, что IP_3 может вызывать диссоциацию комплекса Номер с IP_3R третьего типа [4]. В наших экспериментах pull-down мы обнаружили, что IP_3 может нарушать взаимодействие IP_3R первого типа с белками Номер 1а или Номер 1с (рис. 6А, Б). Эти результа-

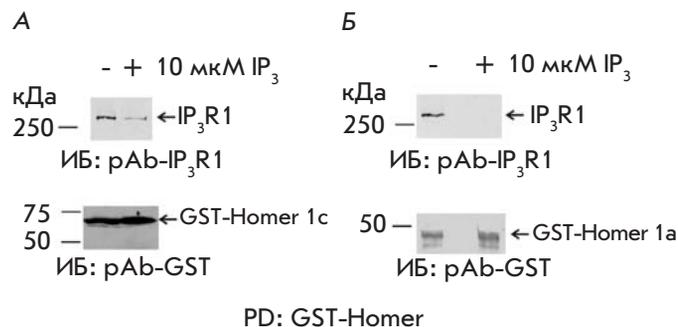


Рис. 6. IP_3 ослабляет взаимодействие белков Номер с IP_3R1 . А, Б – Результаты pull-down-экспериментов. IP_3R1 инкубировался с GST-Homer 1с (А) или GST-Homer 1а (Б) в отсутствие или в присутствии 10 мкМ IP_3 .

ты хорошо согласуются с данными экспериментов inside-out, показывающими, что действие IP_3 и действие белка Номер 1а или пептида РРККFR не аддитивны.

Таким образом, в данной работе впервые исследована регуляция нативных депо-управляемых каналов белками семейства Номер. Полученные результаты расширяют представления о механизмах организации компонентов депо-управляемого входа. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы Министерства образования и науки (ГК 02.740.11.5007) и (ГК П332), Программы Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”, грантов РФФИ (№ 09-04-12035, 10-04-01002, 10-04-00956), гранта “Ведущие научные школы” (НШ-3796.2010.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Parekh A.B., Putney J.W., Jr. // *Physiol. Rev.* 2005. V. 85. № 2. P. 757–810.
- Tu J.C., Xiao B., Yuan J.P., et al. // *Neuron.* 1998. V. 21. P. 717–726.
- Yuan J.P., Kiselyov K., Shin D. M., et al. // *Cell.* 2003. V. 114. P. 777–789.
- Kim J.Y., Zeng W., Kiselyov K., et al. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 43. P. 32540–32549.
- Worley P.F., Zeng W., Huang G., et al. // *Cell Calcium.* 2007. V. 42. № 4–5. P. 363–371.
- Hayashi M.K., Tang C., Verpelli C., et al. // *Cell.* 2009. V. 137. № 1. P. 159–171.
- Hayashi M.K., Ames H.M., Hayashi Y. // *J. Neurosci.* 2006. V. 26. № 33. P. 8492–8501.
- Ango F., Prézeau L., Muller T., et al. // *Nature.* 2001. V. 411. № 6840. P. 962–965.
- Feng W., Tu J., Yang T., et al. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 47. P. 44722–44730.
- Kaznacheeva E., Lupu V.D., Bezprozvanny I. // *J. Gen. Physiol.* 1998. V. 111. P. 847–856.
- Kaznacheeva E., Glushankova L., Bugaj V., et al. // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. № 32. P. 23655–23662.
- Nиколаев А.В., Скопин А.Ю., Казначеева Е.В. // *Биол. мембраны.* 2004. Т. 21. № 6. С. 451–457.
- Kiselyov K.I., Mamin A.G., Semyonova S.B., Mozhayeva G.N. // *FEBS Lett.* 1997. V. 407. P. 309–312.
- Kiselyov K.I., Semyonova S.B., Mamin A.G., Mozhayeva G.N. // *Pflügers Arch.* 1999. V. 437. P. 305–314.
- Zubov A.I., Kaznacheeva E.V., Nikolaev A.V., et al. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 25983–25985.
- Kaznacheeva E., Zubov A., Gusev K., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. P. 148–153.
- Gusev K., Glouchankova L., Zubov A., et al. // *J. Gen. Physiol.* 2003. V. 122. P. 81–94.
- Bugaj V., Alexeenko V., Zubov A., et al. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 16790–16797.
- Feng W., Tu J., Pouliquin P., et al. // *Cell Calcium.* 2008. V. 43. № 3. P. 307–314.
- Pouliquin P., Pace S.M., Dulhunty A.F. // *Pflügers Arch.* 2009. V. 458. P. 723–732.
- Shin D.M., Dehoff M.D., Luo X., et al. // *J. Cell Biol.* 2003. V. 162. P. 293–303.
- Bosanac I., Yamazaki H., Matsu-Ura T., et al. // *Mol. Cell.* 2005. V. 17. P. 193–203.

УДК 577.113.5, 577.151.4

Олигонуклеотидный микрочип для идентификации генов карбапенемаз молекулярных классов А, В и D

М. М. Уляшова¹, Ю. И. Халилова¹, М. Ю. Рубцова^{1,2*}, М. В. Эйдельштейн³,
И. А. Александрова⁴, А. М. Егоров¹

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

² ЗАО «НПП ИММУНОТЕХ», 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 11А

³ НИИ антимикробной химиотерапии, Смоленская государственная медицинская академия, 214019, Смоленск, а/я 5

⁴ НИИ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко РАМН, 125047, Москва, 4-я Тверская-Ямская ул., д. 16

*E-mail: mrubtsova@gmail.com

Поступила в редакцию 23.08.2010 г.

РЕФЕРАТ Разработан метод гибридизационного анализа на ДНК-микрочипах для одновременной идентификации и типирования генов, кодирующих ферменты карбапенемазы, продуцируемые микроорганизмами – возбудителями инфекционных заболеваний. Метод состоит из нескольких этапов, включающих выделение ДНК из клинического образца, амплификацию генов карбапенемаз методом мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с одновременным включением биотина в качестве метки, гибридизацию меченого ПЦР-продукта с олигонуклеотидными зондами, иммобилизованными на поверхности ДНК-микрочипа на основе нитроцеллюлозы. Молекулы биотина в ДНК-дуплексах выявляются конъюгатом стрептавидин-пероксидаза хрена с последующей колориметрической детекцией фермента. Был выполнен дизайн олигонуклеотидных зондов и оптимизированы условия гибридизационного анализа на мембранных микрочипах для идентификации семи типов генов карбапенемаз, относящихся к молекулярным классам А, В и D с дополнительным типированием на подгруппы. Тестирование микрочипов проводили с использованием контрольных штаммов микроорганизмов, несущих гены карбапенемаз, охарактеризованных методом секвенирования. Разработанный метод гибридизационного анализа применен для исследования клинических штаммов *Pseudomonas* spp. и *Acinetobacter* spp., продуцирующих карбапенемазы различных классов по данным фенотипических тестов. Все штаммы *Acinetobacter baumannii*, резистентные к карбапенемам, являлись носителями генов двух ОХА-карбапенемаз (ОХА-51 в сочетании с ОХА-23 (1 штамм), ОХА-40 (5 штаммов) или ОХА-58 (4 штамма)). У всех резистентных к карбапенемам штаммов *Pseudomonas aeruginosa* был обнаружен ген металло-β-лактамазы VIM-2-типа. При тестировании штаммов, чувствительных к карбапенемам, гены карбапенемаз не обнаружены. Метод идентификации генов карбапенемаз на микрочипе характеризуется хорошей точностью и производительностью. Он может быть использован в клинических микробиологических лабораториях для идентификации и изучения эпидемиологии карбапенемаз.

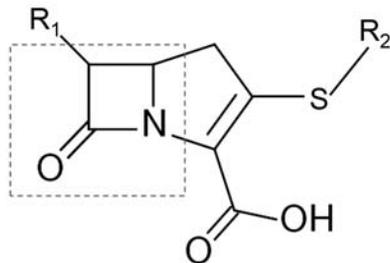
КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ДНК-микрочипы, пероксидаза хрена, колориметрическая детекция, антибиотикорезистентность, карбапенемазы.

ВВЕДЕНИЕ

В течение последних 20 лет β-лактамы антибиотиков прочно удерживают одно из лидирующих положений в лечении широкого круга тяжелых инфекций, вызываемых грамотрицательными микроорганизмами. Среди них одной из наиболее удачных групп антибактериальных препаратов являются карбапенемы, химическая структура которых изображена на рис. 1. Действие этой группы антибиотиков характеризуется широким спектром активности, низкой

токсичностью, хорошими фармакокинетическими параметрами [1]. Вместе с тем эффективность их применения в последнее время ограничена вследствие развития антибиотикорезистентности, или устойчивости микроорганизмов к действию антибиотиков. Устойчивые к карбапенемам штаммы микроорганизмов наиболее часто встречаются у возбудителей нозокомиальных (внутрибольничных) инфекций, относящихся к родам *Pseudomonas* spp. и *Acinetobacter* spp. В лечебных учреждениях РФ также отмечается

Рис. 1. Химическая структура карбапенемов. β -Лактамное кольцо обозначено пунктиром.



заметный рост числа возбудителей, нечувствительных к действию карбапенемов, среди *Pseudomonas aeruginosa* число таких штаммов составляет уже 38% [2].

Формирование резистентности к β -лактамам антибиотикам у представителей грамотрицательных бактерий может быть связано с различными механизмами, включающими изменение проницаемости наружной клеточной мембраны из-за возникновения дефектов пориновых каналов [3, 4], активацией систем эффлюкса [5], однако наибольшее клиническое и эпидемиологическое значение имеет продукция бактериальных ферментов, гидролизующих β -лактаманное кольцо антибиотиков – β -лактамаз [6, 7]. В настоящее время известные β -лактамазы разделяют по структуре первичной последовательности белка на четыре молекулярных класса – А, В, С и D. Ферменты классов А, С и D относятся к гидролазам серинового типа, ферменты класса В являются металлосодержащими гидролазами, в активном центре которых содержатся один или два атома цинка [8]. Карбапенемазной активностью обладают представители разных молекулярных классов β -лактамаз, однако наиболее распространенными и клинически важными в настоящее время являются карбапенемазы КРС-типа из молекулярного класса А [9], пяти групп металло- β -лактамаз (VIM, IMP, SPM, GIM, SIM) [10], а также ряд ферментов ОХА-типа из молекулярного класса D (подгруппы ОХА-23, ОХА-40, ОХА-51, ОХА-58) [11].

Из всего многообразия β -лактамаз именно карбапенемазы представляют собой наибольшую угрозу, так как обладают высокой каталитической активностью и широким спектром субстратной специфичности, включающим практически все классы β -лактаманых антибиотиков. Вследствие плазмидной локализации генов распространение карбапенемаз среди возбудителей инфекционных заболеваний человека происходит достаточно быстро. В связи с многообразием и опасностью широкого распространения карбапенемаз необходимы надежные методы выявления продукции ферментов данного типа как для выбора оптимального способа лечения пациентов, так и для эпидемиологического контроля за распространением данного типа антибиотико-

резистентности. В настоящее время для этих целей в основном используются микробиологические тесты [6, 12, 13]. Однако они длительны и часто малоэффективны при определении типа карбапенемаз. Трактовка их результатов не всегда однозначна, особенно в случаях, когда наблюдается продукция нескольких типов β -лактамаз одновременно. Определение ферментов ОХА-типа с помощью фенотипических тестов практически невозможно [14].

Предложено несколько методов на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) для идентификации генов металло- β -лактамаз, принадлежащих к наиболее распространенным группам – VIM и IMP [15, 16], основных подгрупп карбапенемаз ОХА-типа [17]. Разработан метод мультиплексной ПЦР в режиме реального времени с последующим анализом кривых плавления полученных ампликонов для идентификации генов 5 групп металло- β -лактамаз [18]. Однако мультиплексная способность метода ПЦР, как правило, ограничена, что не позволяет одновременно детектировать большое количество генов.

Перспективным методом идентификации как с точки зрения времени получения результата анализа, так и его информативности является метод гибридизационного анализа на ДНК-микрочипах. Данная технология имеет значительные преимущества перед традиционными методами, так как позволяет проводить многопараметрический анализ, а также миниатюризировать исследуемый образец, что значительно снижает стоимость анализа и время его проведения [19, 20].

Целью данной работы являлась разработка метода гибридизационного анализа на мембранных ДНК-микрочипах с колориметрической детекцией для определения генов карбапенемаз, относящихся к молекулярным классам А, В и D.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Набор праймеров для амплификации генов карбапенемаз и аминомодифицированные олигонуклеотидные зонды были синтезированы фирмой «Синтол» (Москва, Россия). Образцы бактериальной ДНК, выделенные из контрольных штаммов *A. baumannii*, *Ps. aeruginosa*, *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae*, продуцирующих карбапенемазы VIM-1, VIM-2, VIM-4, VIM-7, IMP-1, IMP-2, SPM-1, ОХА-23, ОХА-40, ОХА-51, ОХА-58, КРС-3, предоставлены сотрудниками НИИ антимикробной химиотерапии Смоленской государственной медицинской академии. Культуры клеток микроорганизмов семейства Enterobacteriaceae, *A. baumannii* и *Ps. aeruginosa*, чувствительные и устойчивые к действию карбапенемов по данным фенотипического определения на автоматическом анализаторе VITEK (BioMerieux, Фран-

ция), предоставлены сотрудниками НИИ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко.

Выделение бактериальной ДНК

Выделение бактериальной ДНК из суспензии культуры исследуемого микроорганизма, содержащей не менее 10^5 КОЕ/мл, проводили с помощью температурного лизиса в буфере. Для этого 500 мкл суспензии помещали в центрифужные пробирки и осаждали микробные клетки центрифугированием в течение 1 мин при 10000 *g*. Супернатант удаляли, добавляли 100 мкл буфера (10 мМ Трис-НСl, 1 мМ ЭДТА, pH 7.5) и ресуспендировали осадок с помощью шейкера. Пробирки инкубировали в твердотельном термостате в течение 20 мин при 99°C. После термостатирования образцы центрифугировали в течение 1 мин при 10000 *g*. Для ПЦР использовали 1 мкл супернатанта.

Аmplификация генов карбапенемаз методом мультиплексной ПЦР с одновременным введением биотина в качестве метки

Аmplификацию фрагментов генов карбапенемаз молекулярных классов А, В и D с одновременным включением биотина в качестве метки проводили в процессе двух мультиплексных ПЦР (в одной реакции амплифицировались гены всех групп металло-β-лактамаз, а в другой – гены β-лактамаз ОХА- и КРС-типов). Каждая мультиплексная ПЦР проводилась в объеме 25 мкл, содержащем 10 мМ Трис-НСl-буфер с 2.5 мМ ацетата магния, 50 мМ КСl, pH 8.3, 2.5 ед. *Taq*-ДНК-полимеразы, 100 мкМ dATP, dGTP, dCTP, 60 мкМ dTTP, 40 мкМ dUTP-11-биотин (Fermentas, Германия), по 0.4 мкМ прямого и обратного праймеров для каждой группы карбапенемаз и 1 мкл раствора матрицы ДНК. Амплификацию проводили в амплификаторе Mastercycler gradient (Eppendorf, Германия) по следующему протоколу: начальная денатурация при 94°C (2 мин), 25 циклов амплификации (20 с – денатурация при 94°C, 30 с – отжиг праймеров при 65°C, 1 мин – элонгация при 72°C), завершающий этап элонгации при 72°C (6 мин). Горизонтальный электрофорез продуктов ПЦР проводили в геле 1% агарозы с использованием ТАЕ-буфера (40 мМ Трис, 20 мМ уксусной кислоты, 1 мМ ЭДТА, pH 8.5) и с добавлением бромистого этидия до конечной концентрации 1.6 мкг/мл. Визуализацию проводили на УФ-транслюминаторе при длине волны 260 нм.

Фрагментация ПЦР-продуктов

Фрагментацию ДНК проводили при комнатной температуре в течение 5 мин. Для этого амплифицированную ДНК растворяли до конечной концентрации 30 нг/мкл в реакционном буфере (40 мМ Трис-НСl,

10 мМ MgSO₄, 1 мМ CaCl₂, pH 8.0) и добавляли ДНКазу I (Promega, Германия). Реакцию останавливали, добавляя 3 мМ ЭДТА и инкубируя 10 мин при 65°C.

Иммобилизация олигонуклеотидных зондов на мембранном ДНК-микрочипе

В качестве мембранного носителя для ДНК-микрочипов использовали нитроцеллюлозу BioTrace NT (Pall Corporation, США). Модификация мембран осуществлялась с помощью 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимиды (Sigma, США) по методике, описанной в [21]. Для иммобилизации олигонуклеотиды растворяли в солевом буфере (160 мМ Na₂SO₄, 130 мМ Na₂HPO₄) до концентрации 20 мкМ и наносили роботом XactII™ Arrayer (LabN-EXT Inc., США) с иглами диаметром 300 мкм на мембраны, после чего мембраны инкубировали в термостате при 60°C в течение 30 мин.

Гибридизация на ДНК-микрочипе

Перед проведением гибридизации микрочипы отмывали буфером ФСБТ (0.01 М K₂HPO₄, 0.15 М NaCl, 0.05% Твин-20, pH 7.0) 2 раза по 10 мин при комнатной температуре и блокировали в растворе 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 1% казеина (Sigma, США) в буфере ФСБ (0.01 М K₂HPO₄, 0.15 М NaCl, pH 7.0) при 37°C в течение 30 мин. 500 нг фрагментированной меченой ДНК растворяли в гибридизационном буфере 2x SSPE (0.3 М NaCl, 0.02 М NaH₂PO₄, 2 мМ ЭДТА, pH 7.4), содержащем 1.6 пмоль/мл контрольного олигонуклеотида, меченного биотином (положительный контроль гибридизации). Микрочип помещали в гибридизационную смесь (300 мкл на 1 микрочип) и инкубировали в течение 1 ч при 45°C в термомиксере Thermomixer comfort (Eppendorf, Германия). После гибридизации проводили отмывку мембран ФСБТ – 2 раза по 15 мин при комнатной температуре.

Детекция и обработка результатов гибридизации

Для детекции результатов гибридизации микрочипы инкубировали в ФСБТ, содержащем конъюгат стрептавидин-пероксидаза хрена (Имтек, Россия) в концентрации 0.2 мкг/мл в ФСБТ, в течение 30 мин при 37°C. Далее микрочипы отмывали ФСБТ 10 мин, ФСБ 10 мин при комнатной температуре при перемешивании и помещали на 10 мин в субстратный раствор на основе 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) и H₂O₂ (НВО Иммунотех, Россия) с добавлением декстрансульфата натрия (M_r = 8000, Pharmacia, Швеция) до конечной концентрации 0.5% (по массе), после чего их промывали дистиллированной водой и сушили на воздухе. Мембранные микрочипы сканировали на сканере Perfection V750 Pro (Epson, Германия)

при разрешении 4800 dpi. Полученные изображения (в TIFF-формате) анализировали с использованием программы Scan Array Express (PerkinElmer, version 3.0, Германия) и определяли значения интенсивностей аналитических сигналов в различных участках микрочипа. Далее значения абсолютных интенсивностей сигналов переводили в относительные нормированием на усредненную интенсивность положительного контроля гибридизации на данном микрочипе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Молекулярный дизайн олигонуклеотидных зондов

На настоящий момент в Международном банке данных GenBank имеется информация о 10 ферментах КРС-типа, 52 металло-β-лактамазах (23 фермента из группы IMP, 26 – из группы VIM и по одному представителю из групп SPM, SIM и GIM), а также 70 карбапенемазах из группы ОХА. Выравнивание аминокислотных и кодирующих последовательностей данных ферментов показало, что лишь ферменты группы КРС имеют высокую степень гомологии внутри группы (отличаются друг от друга наличием 1–2 аминокислотных замен), тогда как многочисленные представители групп IMP, VIM и ОХА отличаются друг от друга по своим последовательностям достаточно сильно. В связи с этим каждую из этих групп дополнительно разделили на подгруппы, внутри которых гены ферментов по своим нуклеотидным последовательностям имели высокую степень гомологии. Так, в группе VIM было выделено 3 подгруппы

ферментов (VIM-1, VIM-2 и VIM-7), в группе IMP – 6 подгрупп (IMP-1, IMP-2, IMP-5, IMP-11, IMP-12 и IMP-14), а карбапенемазы группы ОХА были разделены на 4 подгруппы – ОХА-23, ОХА-40, ОХА-51 и ОХА-58. Разделение карбапенемаз на группы и подгруппы на основании выравнивания аминокислотных последовательностей и их соответствие молекулярным классам β-лактамаз приведены на *рис. 2*.

Основным этапом разработки ДНК-микрочипа являлся выбор последовательностей олигонуклеотидных зондов для определения генов карбапенемаз различных групп. Выбор последовательностей олигонуклеотидов для идентификации группы ферментов осуществлялся на основе выравнивания кодирующих последовательностей генов всех карбапенемаз, принадлежащих к данной группе. Для этого находили достаточно протяженный участок гена, последовательность которого была консервативна для всех представителей группы и содержала не менее 18 нуклеотидов. Для них рассчитывали температуру плавления, G/C-состав и свободную энергию образования димеров и вторичных структур. Для гибридизационного анализа на микрочипах отбирали олигонуклеотиды, для которых вероятность образования вторичных структур была минимальна и температуры плавления различались не более чем на 10°C. На основе выбранных последовательностей синтезировали по два олигонуклеотидных зонда, последовательность которых была комплементарна прямой и обратной цепи гена. Для дополнительного типирования генов IMP, VIM и ОХА карбапенемаз на уров-

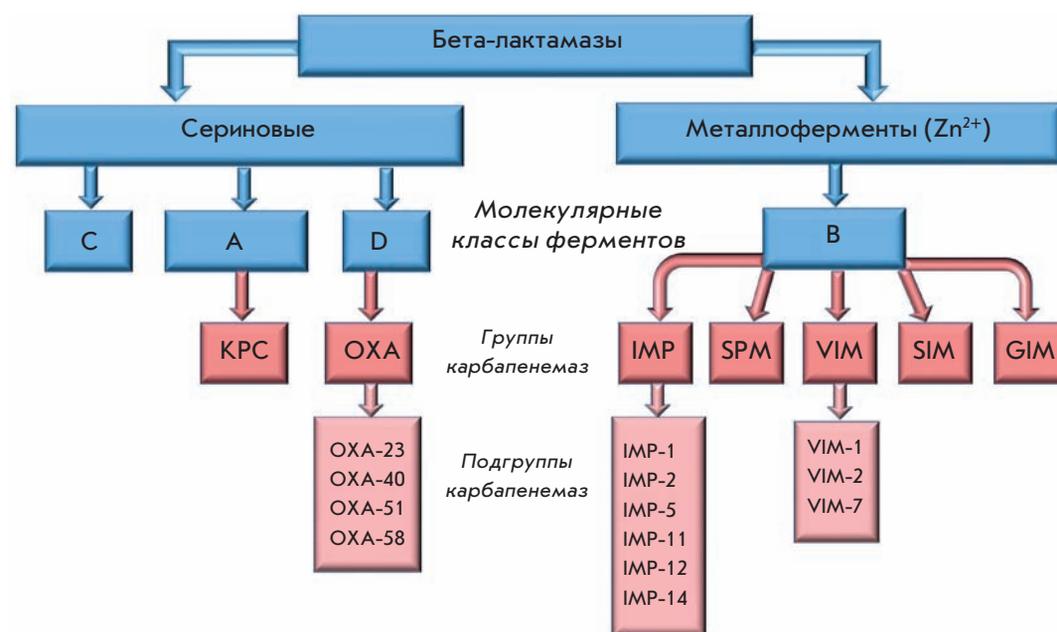


Рис. 2. Разделение карбапенемаз на группы и подгруппы на основании выравнивания аминокислотных последовательностей и их соответствие молекулярным классам β-лактамаз.

не подгрупп последовательности олигонуклеотидных зондов выбирали на основе гомологичных участков генов, не содержащих мутаций внутри данной подгруппы и не имеющих гомологии с генами других подгрупп. Чтобы повысить специфичность анализа, для идентификации каждой подгруппы ферментов выбирали по два варианта олигонуклеотидных зондов, соответствующих разным участкам гена. В этом случае синтезировали зонды, последовательность которых была комплементарна обратной цепи гена.

Последовательности выбранных олигонуклеотидов и их основные характеристики представлены в *табл. 1*. Длина зондов варьировала от 18 до 27 нуклеотидов, G/C-состав – от 30 до 60%, температура плавления – в диапазоне 63–72°C. Во все зонды были введены дополнительные спейсеры на 5'-конце, удаляющие зонд от поверхности носителя, что позволило снизить стерические затруднения при гибридизации и повысить доступность зонда для ДНК-мишени. Было установлено, что оптимальным является использование спейсера из 13 тимидиновых остатков, добавление дополнительных остатков тимидина не оказало существенного влияния на величину получаемых абсолютных гибридизационных сигналов и специфичность гибридизации (данные не приводятся).

Амплификация генов карбапенемаз различных молекулярных классов с одновременным включением метки

Для амплификации генов карбапенемаз, относящихся к молекулярным классам А, В и D, разрабатывали метод мультиплексной ПЦР с одновременным введением метки – биотина. Для введения метки использовали меченный биотином дезоксирибоуринтрифосфат (dUTP), который включался в цепь ДНК одновременно с немеченым дезоксириботимидинтрифосфатом (dTTP). В качестве матрицы для ПЦР использовали бактериальную ДНК, выделенную из контрольных штаммов микроорганизмов-продуцентов β-лактамаз VIM-1, VIM-2, VIM-7, IMP-1, IMP-2, SPM-1, OXA-23, OXA-40, OXA-51, OXA-58 и KPC-3.

Выбор праймеров для амплификации генов карбапенемаз различных групп осуществлялся на основе ранее выполненного выравнивания кодирующих последовательностей генов ферментов данных групп. В качестве праймеров для амплификации полноразмерных генов карбапенемаз группы KPC и металло-β-лактамаз групп SPM, SIM и GIM выбирались консервативные для группы участки последовательностей, расположенные на концах генов. Для металло-β-лактамаз групп IMP, VIM и карбапенемаз OXA-типа консервативные участки на концах

генов длиной более 20 п.н. найти не удалось в связи с низкой гомологией ферментов внутри данных групп, поэтому праймеры были выбраны отдельно для каждой подгруппы.

Длина праймеров (20 – 28 нуклеотидов) подбиралась таким образом, чтобы температура плавления была в диапазоне 62 – 68°C, что позволяло бы одновременно амплифицировать все типы генов с одинаковой эффективностью. При выборе структур праймеров учитывали G/C-состав и отбирали структуры, для которых содержание G/C находилось в диапазоне 30 – 60%. Также оценивали вероятность образования праймер-димеров и вторичных структур и выбирали те последовательности, для которых такая вероятность была минимальна. В результате, для каждой группы ферментов было выбрано по несколько прямых и обратных праймеров, различающихся по своим параметрам. Их различные комбинации были проверены в ПЦР в условиях амплификации специфических для них генов, и пара праймеров, позволяющая получить наиболее специфические ПЦР-продукты с хорошим выходом реакции, была использована в дальнейшем для мультиплексной ПЦР. Последовательности данных праймеров представлены в *табл. 2*.

Для выбора температуры отжига праймеров для мультиплексной амплификации всех типов генов карбапенемаз сначала определяли оптимальные температуры отжига (T_a) для каждой пары праймеров отдельно в условиях специфических реакций, затем для мультиплексной ПЦР в качестве T_a выбирали наименьшую. Диапазон значений исследуемых T_a праймеров составил 52 – 68°C. Оптимальной T_a оказалась температура 60°C, при которой для всех типов генов наблюдался эффективный синтез только специфических ПЦР-продуктов.

После оптимизации условий амплификации генов карбапенемаз с выбранными праймерами была исследована возможность проведения мультиплексной ПЦР с 16 парами праймеров для одновременной амплификации генов карбапенемаз всех рассматриваемых групп. Однако в этих условиях для большинства карбапенемаз специфический продукт амплификации отсутствовал либо выход продукта амплификации был очень низким, что делало невозможным последующее проведение гибридизационного анализа на микрочипах. Поэтому было решено проводить амплификацию генов карбапенемаз в процессе двух мультиплексных ПЦР: одну – со смесью праймеров для металло-β-лактамаз (11 пар праймеров), а другую – со смесью праймеров для OXA и KPC карбапенемаз (5 пар праймеров). Результаты электрофоретического разделения ПЦР-продуктов, полученных при амплификации генов различных карбапенемаз

Таблица 1. Последовательности специфических и контрольных олигонуклеотидных зондов

Название	Нуклеотидная последовательность, 5'→3'	Длина, нуклеотиды	G/C, %	T _{пл} , °C
Контрольные олигонуклеотиды				
Контроль иммобилизации	TCTAGACAGCCACTCATA-Биотин	18	44.4	60.4
Положительный контроль гибридизации	GATTGGACGAGTCAGGAGC	19	57.9	66.1
Отрицательный контроль гибридизации	TCTAGACAGCCACTCATA	18	44.4	60.4
Олигонуклеотидные зонды для определения группы карбапенемаз				
KPC_прямой	GCTTCCCCTGTGCAGCTCATTC	23	56.5	72.0
KPC_обратный	GAATGAGCTGCACAGTGGGAAGC	23	56.5	72.0
VIM_прямой	GGAGATTGAAAAGCAAATTGGACT	24	37.5	66.6
VIM_обратный	AGTCCAATTTGCTTTTCAATCTCC	24	37.5	66.6
IMP_прямой	GGAATAGAGTGGCTTAATTCCTCG/A	23	41.3	64.7
IMP_обратный	C/TGAGAATTAAGCCACTCTATTCC	23	41.3	64.7
SPM_прямой	GATGGGACCGTTGTCATTG	19	52.6	64.9
SPM_обратный	CAATGACAACGGTCCCATC	19	52.6	64.9
SIM_прямой	CCTTGGCAATCTAAGTGACGCAA	23	47.8	69.7
SIM_обратный	TTGCGTCACTTAGATTGCCAAGG	23	47.8	69.7
GIM_прямой	CACACTGGGAAATGGGCTTATA	22	45.5	66.7
GIM_обратный	TATAAGCCATTTCCAGTGTG	22	45.5	66.7
OXA_прямой	CCACAA/GGTG/AGGC/TTGGTTG/AAC	20	55.0	67.0
OXA_обратный	GTC/AAACCAG/ACCC/ТАСТ/СТGTGG	20	55.0	67.0
Олигонуклеотидные зонды для определения подгруппы карбапенемаз				
VIM-1_568	TCAGCGAACGTGCTATACGG	20	55.0	68.3
VIM-1_590	GTTGTGCCGTTTCATGAGTTGT	21	47.6	67.9
VIM-2_568	TCTGCGAGTGTGCTCTATGG	20	55.0	67.9
VIM-2_590	GTTGTGCCGATTTATGAGTTGT	21	38.1	63.7
VIM-7_127	GTTCGGCTGTACAAGATTGGCG	22	54.5	70.0
VIM-7_181	CTCGGTGACACGGTGTAC	18	61.1	65.8
IMP-1_135	GTGGGGCGTTGTTCCATAACATG	23	52.2	70.2
IMP-1_387	GGTTCAAGCCACAAATTCATTTAGC	25	40.0	67.8
IMP-2_264	TCAAAGGCACTATTTCCCTCACATTTT	26	38.5	68.2
IMP-2_497	TACCTGAAAAGAAAATTTTATTCTGGTG	27	29.6	65.7
IMP-5_506	AATAGAGTTTTGTTCCGGTGGTT	22	36.4	65.0
IMP-5_459	TGGTCCAGGGCACACTCC	18	66.7	70.4
IMP-11_570	TGTTGAAGCATGGCCACATT	20	45.0	67.6
IMP-11_621	TGCAAAACTGGTTGTTCCAAGCC	23	47.8	70.9
IMP-12_226	AAATTAGTTGCTTGGTTTGTAGGG	24	37.5	66.4
IMP-12_495	GCTACCTGAAAACAAAATTTTATTCTG	26	30.8	64.8
IMP-14_292	GGTGACAGTACGGCTGGAATAG	22	54.5	68.4
IMP-14_374	AAAAAGACAATAAGGTACAAGCTA	24	29.2	63.4
OXA-23_225	AAATACAGAATATGTGCCAGCCTCT	25	40.0	68.8
OXA-23_309	GAAGGGCGAGAAAAGGTCATTTAC	24	45.8	68.0
OXA-40_225	AAATAAAGAATATGTCCCTGCATCA	25	32.0	65.6
OXA-40_329	GAACTTATCCTATGTGGGAGAAAG	24	41.7	64.8
OXA-51_225	TTCGACCGAGTATGTACCTGCTTCG	25	52.0	71.7
OXA-51_578	GCCCAAAAGTCCAAGATGAAG	21	47.6	65.8
OXA-58_225	AAAAACAGCTTATATTCCTGCATCT	25	32.0	66.0
OXA-58_206	GCACGCATTTAGACCGAGC	19	57.9	67.7

Таблица 2. Последовательности праймеров для мультиплексных ПЦР-амплификаций генов карбапенемаз

Тип		Последовательность 5'→3'	Длина, нуклеотид	G/C, %	T _{пл} , °C	Размер ПЦР-продукта, п.н.
KPC	прямой	TTCTGCTGTCTTGTCTCTCATGG	23	47.8	64.7	801
	обратный	CCTCGCTGTGCTTGTTCATCC	20	60.0	65.7	
IMP-1	прямой	GGCGTTTATGTTTCATACTTCGTTTG	25	40.0	64.4	584
	обратный	GTAAGTTTCAAGAGTGATGCGTCTCC	26	46.2	65.6	
IMP-2	прямой	GGTGTTTATGTTTCATACATCGTTCG	25	40.0	63.8	584
	обратный	GTACGTTTCAAGAGTGATGCGTCCCC	26	53.8	67.8	
IMP-5	прямой	GGTGTTTATGTTTCATACTTCGTTTG	25	36.0	62.5	584
	обратный	GTACGTTTCAAGAGTGATACATCTCC	26	42.3	63.4	
IMP-11	прямой	GGTGTTTATGTTTCATACATCGTTTG	25	36.0	62.6	584
	обратный	GTAAGTTTCAAGAGCGACGCATCTCC	26	53.8	67.8	
IMP-12	прямой	GGTGTTTATCTTCATACATCTTTTG	25	32.0	60.5	584
	обратный	GTAAGTTTCAAGAGTGATGCGTCTCC	26	46.2	66.0	
VIM-1	прямой	GTAGTTTATTTGGTCTACATGACCGCGTC	28	46.4	66.9	743
	обратный	CGCTGTGTGCTGGAGCAAGTC	21	61.9	68.1	
VIM-2	прямой	GTAAGTTATTTGGTCTATTTGACCGCGTC	28	42.9	65.9	743
	обратный	CGTTGTGTGCTTGAGCAAGTC	21	52.4	64.7	
VIM-7	прямой	AGCATATTTCCGCACAGCCTGG	21	57.1	67.5	685
	обратный	CCGGGCGGTCTGGAATTGCTC	21	66.7	67.7	
SPM	прямой	CGTTTTGTTTGTGCTCGTTGCGGG	25	52.0	67.4	648
	обратный	CCTTCACATTGGCATCTCCCAGATAAC	27	48.1	67.2	
SIM	прямой	GTTTGCGGAAGAAGCCCAGCC	21	61.9	68.6	613
	обратный	CTCCGATTTCACTGTGGCTTGGG	23	56.5	67.6	
GIM	прямой	CTTGTAGCGTTGCCAGCTTTAGCTC	25	52.0	67.8	638
	обратный	CTGAACTTCCAACTTTGCCATGCC	24	50.0	66.9	
OXA-23	прямой	GAAACCCCGAGTCAGATTGTTCAAG	25	48.0	65.8	686
	обратный	GGCATTTCTGACCGCATTTCC	21	52.4	64.8	
OXA-40	прямой	GTTTCTCTCAGTGCATGTTTCATC	23	43.5	62.3	714
	обратный	CATTTCTAAGTTGAGCGAAAAGGGG	25	44.0	64.6	
OXA-51	прямой	CGAAGCACACACTACGGGTG	20	60.0	65.4	649
	обратный	CTCTTTTCGAACAGAGCTAGGTATTC	26	42.3	63.4	
OXA-58	прямой	CTTGTGCTGAGCATAGTATGAGTC	24	45.8	63.3	684
	обратный	CCACTTGCCCATCTGCCTTTTC	22	54.5	66.5	

из контрольных штаммов микроорганизмов, представлены на рис. 3.

Выход меченых специфических продуктов мультиплексных ПЦР для всех типов исследуемых карбапенемаз составил 40–50 нг/мкл, что являлось достаточным для дальнейшего проведения гибридационного анализа на микрочипах. Амплификация неспецифических продуктов наблюдалась только для генов подгрупп VIM-1 и VIM-2, однако выход их был небольшим, и, как показали последующие экс-

перименты, их наличие не влияло на специфичность гибридационного анализа.

Олигонуклеотидный микрочип для определения генов карбапенемаз молекулярных классов А, В и D
ДНК-микрочип для идентификации основных типов карбапенемаз представлял собой нитроцеллюлозную подложку размером 6.0 x 9.5 мм, на которой в определенном порядке были иммобилизованы 40 олигонуклеотидных зондов (14 зондов для идентификации генов

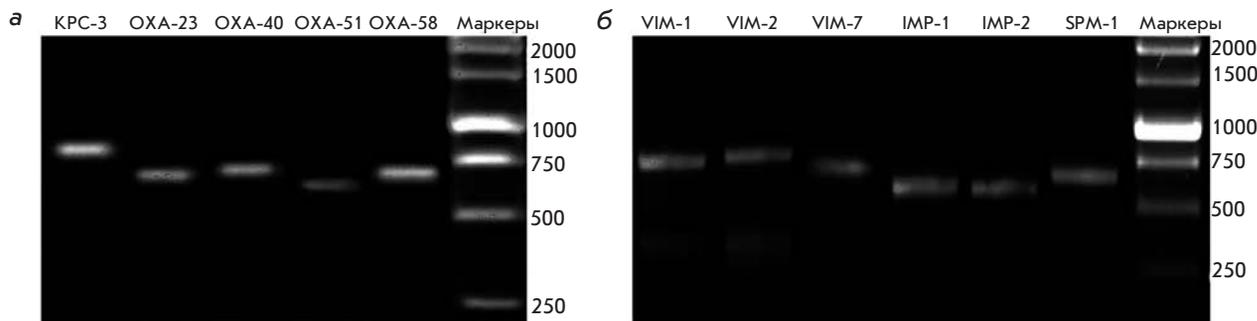


Рис. 3. Электрофореграммы продуктов мультиплексных ПЦР для амплификации генов карбапенемаз ОХА- и КРС-типов (а) и металло-β-лактамаз (б).

7 различных групп карбапенемаз и 26 зондов для дополнительного типирования генов на подгруппы). Также каждый микрочип содержал 3 типа контрольных олигонуклеотидов: контроль иммобилизации (олигонуклеотид, меченный биотином), положительный контроль гибридизации (олигонуклеотид, нуклеотидная последовательность которого комплементарна меченному биотином олигонуклеотиду, добавляемому к гибридизационной смеси), отрицательный контроль гибридизации (олигонуклеотид со случайной последовательностью оснований). Для повышения воспроизводимости анализа каждый олигонуклеотидный зонд наносился на микрочип в трех повторах. Схема расположения специфических и контрольных олигону-

клеотидных зондов на поверхности ДНК-микрочипа изображена на рис. 4.

Процесс идентификации генов карбапенемаз методом гибридизационного анализа на ДНК-микрочипе состоял из следующих этапов: 1) амплификации гена β-лактамазы из клинического материала ДНК в процессе двух мультиплексных ПЦР; 2) гибридизации меченной биотином ДНК с олигонуклеотидными зондами на поверхности микрочипа; 3) детекции результатов гибридизации с использованием конъюгата стрептавидин-пероксидаза с последующей колориметрической детекцией фермента.

Нами была проведена оптимизация условий гибридизации. Диапазон исследованных температур

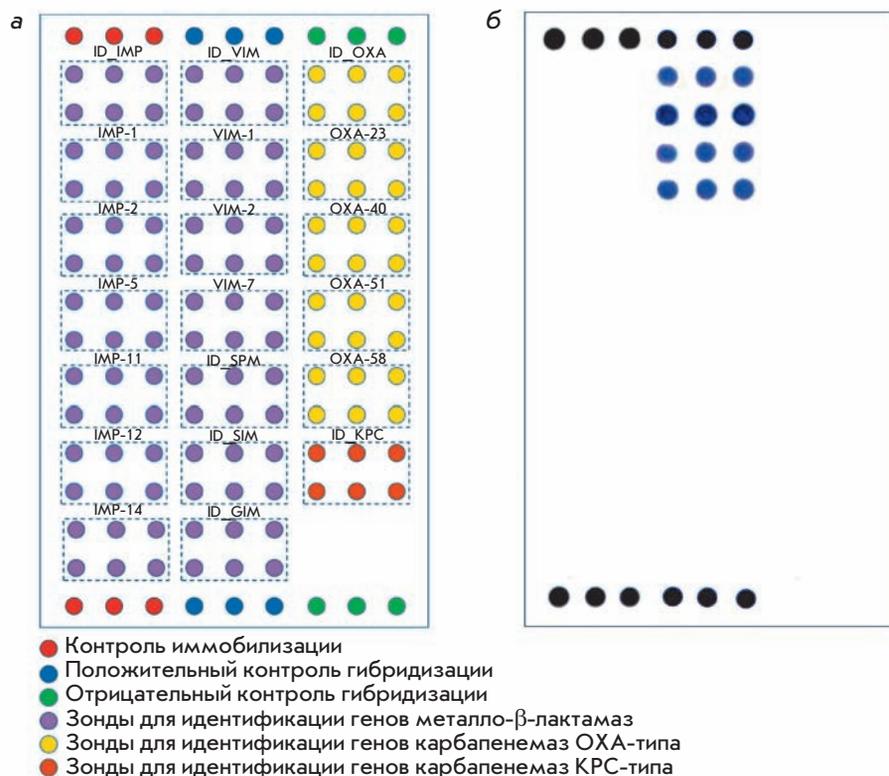


Рис. 4. а – Схема расположения специфических и контрольных олигонуклеотидных зондов на поверхности ДНК-микрочипа для определения генов карбапенемаз классов А, В и D. б – Результат гибридизационного анализа на ДНК-микрочипе контрольного образца *Ps. aeruginosa*, продуцирующего карбапенемазу VIM-1.

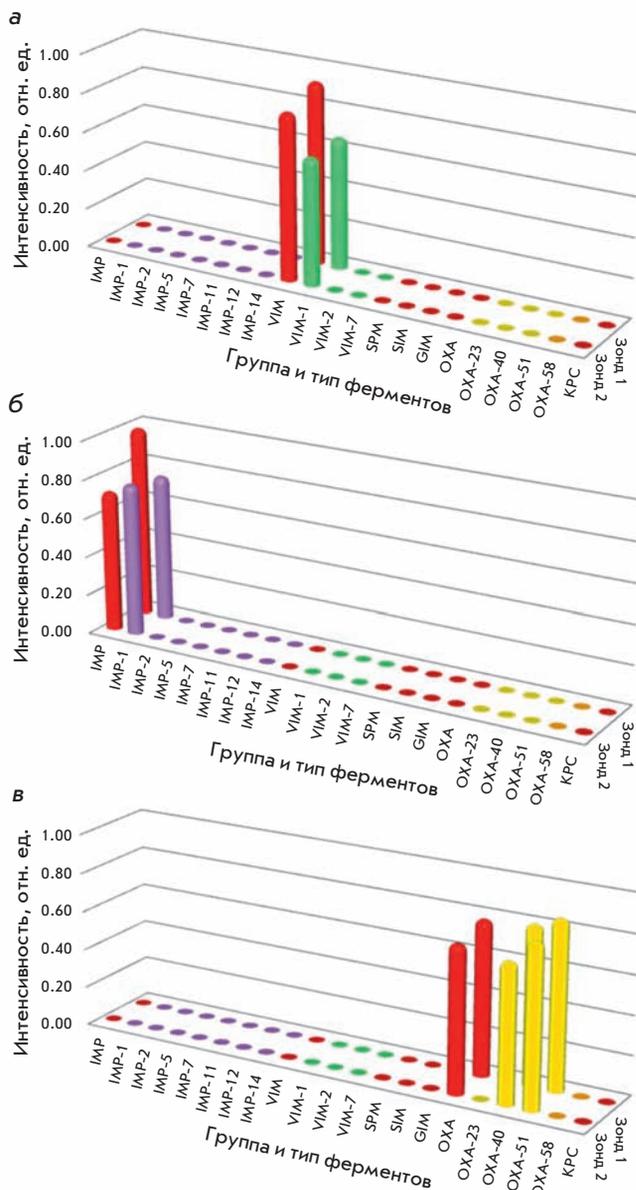


Рис. 5. Результаты гибридационного анализа на ДНК-микрочипе контрольных образцов *Ps. aeruginosa* (а, б) и *A. baumannii* (в), продуцирующих карбапенемазы VIM-1 (а), IMP-1 (б), OXA-51 и OXA-40 (в).

гибридизации составил от 40 до 50°C: он не превышал температуру плавления ($T_{пл}$) отдельных олигонуклеотидных зондов и ограничивался температурой, при которой наблюдали высокий уровень неспецифической гибридационной. При проведении гибридационной при температуре 40°C интенсивность сигналов была достаточно высокой, однако при этом для большинства зондов наблюдали перекрестную гибридационную с фрагментами генов других карбапенемаз. При проведении гибридационной при 50°C интенсивность гибридационных сигналов была низкой для многих

зондов. Поэтому в качестве оптимальной температуры для проведения гибридационной была выбрана температура, равная 45°C. В качестве гибридационного буфера использовали буфер 2x SSPE с добавлением 0.2 % додецилсульфата натрия для улучшения смачиваемости мембраны.

Критическим параметром, определяющим эффективность гибридационной, оказался размер меченой ДНК-мишени. Гибридационная меченых ПЦР-продуктов, размер которых составлял 580–800 нуклеотидов, с соответствующими олигонуклеотидными зондами характеризовалась сигналами небольшой интенсивности. Дополнительная фрагментация с помощью ДНКазы до фрагментов размером 50–150 нуклеотидов приводила к значительному увеличению интенсивности гибридационных сигналов практически для всех зондов.

Оптимизация времени гибридационной была проведена в диапазоне от 0.5 до 4.0 ч. Было показано, что реакция гибридационной меченой биотином ДНК с иммобилизованными на микрочипе зондами достигает состояния равновесия в течение 2 ч при интенсивном перемешивании. Также было установлено, что при проведении реакции гибридационной в кинетическом режиме (1 ч) интенсивность регистрируемых сигналов незначительно ниже равновесных значений (на 10 – 20% в зависимости от типа зонда), при этом специфичность анализа сохранялась на хорошем уровне, что позволяло достоверно идентифицировать наличие генов всех типов карбапенемаз в гибридационной смеси.

На рис. 5 приведены результаты тестирования на ДНК-микрочипе контрольных штаммов микроорганизмов, продуцирующих металло-β-лактамазы VIM-1 и IMP-1 и карбапенемазы OXA-51 и OXA-40. Идентификацию группы β-лактамазы проводили по интенсивности гибридационной с групп-специфическим зондом, дополнительное типирование проводили по интенсивности гибридационной с подгрупп-специфическими зондами. К преимуществам метода гибридационного анализа на микрочипах можно отнести возможность одновременной детекции нескольких генов, что было продемонстрировано при тестировании карбапенемаз OXA-типа, продуцируемых контрольным штаммом *A. baumannii*.

Тестирование клинических штаммов микроорганизмов, устойчивых к действию карбапенемов

Разработанный ДНК-микрочип был апробирован на клинических штаммах грамотрицательных микроорганизмов, устойчивых и чувствительных к действию карбапенемов по данным фенотипирования. В табл. 3 представлены результаты тестирования 28 клинических штаммов *Ps. aeruginosa*, *A. baumannii*

Таблица 3. Результаты тестирования клинических образцов на ДНК-микрочипе

Тип микроорганизма	Чувствительность к карбапенемам по данным фенотипирования	Число образцов	Типы найденных карбапенемаз				
			ОХА-23	ОХА-40	ОХА-51	ОХА-58	VIM-2
<i>A. baumannii</i>	Резистентные	10	1	5	10	4	-
<i>Ps. aeruginosa</i>		11	-	-	-	-	11
<i>A. baumannii</i>	Чувствительные	2	-	-	-	-	-
<i>K. pneumonia</i>		3	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>		2	-	-	-	-	-

и *Enterobacteriaceae* spp. с различным уровнем чувствительности к карбапенемам, полученных из НИИ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко и НИИ антимикробной химиотерапии Смоленской государственной медицинской академии. Все штаммы *A. baumannii*, резистентные к карбапенемам по данным фенотипических тестов, были продуцентами генов двух ОХА-карбапенемаз (ОХА-51 и ОХА-23 (1 штамм), ОХА-40 (5 штаммов), ОХА-58 (4 штамма)). У всех резистентных к карбапенемам штаммов *Ps. aeruginosa* был обнаружен ген металло- β -лактамазы VIM-2-типа. При тестировании штаммов, чувствительных к карбапенемам, гены карбапенемаз не обнаружены. Таким образом, результаты гибридного анализа на ДНК-микрочипах хорошо согласуются с данными фенотипирования. Кроме того, для двух образцов – одного *A. baumannii* и одного *Ps. aeruginosa*, резистентных к действию карбапенемов, структура обнаруженных карбапенемаз ОХА-40, ОХА-51 и VIM-2 была подтверждена методом секвенирования.

Таким образом, разработанный метод гибри-

дизационного анализа на ДНК-микрочипах для идентификации и типирования генов карбапенемаз характеризуется хорошей точностью и производительностью и может быть использован в клинических микробиологических лабораториях для идентификации и изучения эпидемиологии карбапенемаз. Используемые в настоящее время фенотипические тесты длительны по времени (от 24 до 48 ч) и не всегда эффективны при определении карбапенемаз, особенно карбапенемаз ОХА-типа. Идентификация генов карбапенемаз на ДНК-микрочипах позволяет осуществлять быструю диагностику, весь анализ от выделения культуры клеток до получения конечного результата занимает около 4.5 ч, включая 0.5 ч на выделение бактериальной ДНК, 1.5 ч на амплификацию генов карбапенемаз и фрагментацию полученных ПЦР-продуктов, 1.5 ч на гибридизацию с последующей отмывкой и 1 ч на колориметрическую детекцию результатов гибридизации. Важной особенностью метода является возможность идентификации нескольких генов в одном образце одновременно. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Галкин Д.В. // Клини. микробиол. антимикроб. химиотер. 2007. Т. 9. С. 133–152.
2. Skleenova E., Shevchenko O., Edelstein M., et al. // Abstracts of 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Vienna, Austria, 2010, 10–13 April. O 562.
3. Livermore D. // J. Antimicrob. Chemother. 2001. V. 47. P. 247–250.
4. Jacoby G., Mills D.M. // Antimicrob. Agents Chemother. 2004. V. 48. P. 3203–3206.
5. Ziha-Zarifi I., Llanes C. // Antimicrob. Agents Chemother. 1999. V. 43. P. 287–291.
6. Queenan A.M., Bush K. // Clin. Microbiol. Rev. 2007. V. 20. P. 440–458.
7. Miriagou V., Cornaglia G., Edelstein M. // Clin. Microbiol. Infect. 2010. V. 16. P. 112–122.
8. Bush K., Jacoby G. // Antimicrob. Agents Chemother. 2010. V. 54. P. 969–976.
9. Rasmussen J.W., Hoiby N. // J. Antimicrob. Chemother. 2007. V. 60. P. 470–482.
10. Walsh T.R., Toleman M.A. // Clin. Microbiol. Rev. 2005. V. 18. P. 306–325.
11. Rasmussen J.W., Hoiby N. // J. Antimicrob. Chemother. 2006. V. 57. P. 373–383.
12. Moland E.S., Hong S.G. // Clin. Microbiol. Newsletter. 2008. V. 30. P. 79–85.
13. Noval M.J., Menezes G.A., Harish B.N., et al. // Indian. J. Med. Res. 2009. V. 129. P. 707–712.
14. Poirel L., Naas T., Nordmann P. // Antimicrob. Agents Chemother. 2010. V. 54. P. 24–38.
15. Шевченко О.В., Эйдельштейн М.В., Степанова М.Н. // Клини. микробиол. антимикроб. химиотер. 2007. Т. 9. С. 211–218.
16. Pitout J.D., Gregson D.B., Poirel L. // J. Clin. Microbiol. 2005. V. 43. P. 3129–3135.
17. Woodford N., Ellington M. // Int. J. Antimicrobial Agents. 2006. V. 27. P. 351–353.
18. Mendes R.E., Kiyota K.A. // J. Clin. Microbiol. 2007. V. 45. P. 544–547.
19. Bilitewski U. // Methods Mol. Biol. 2009. V. 509. P. 1–14.
20. Ehrenreich A. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006. V. 73. P. 255–273.
21. Zhang Y., Coyne M.Y., Will S.G., et al. // Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. P. 3929–3935.

УДК 579.69

Новая тест-система для скрининга ингибиторов серин-треониновых протеинкиназ: конструкт *Escherichia coli* APHVIII/Pk25

О. Б. Беккер¹, М. Г. Алексеева¹, Д. И. Осолодкин², В. А. Палюлин², С. М. Елизаров³,
Н. С. Зефирова², В. Н. Даниленко^{1*}

¹ Учреждение Российской академии наук Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991, Москва, ул. Губкина, 3

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

³ Учреждение Российской академии наук Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33

*E-mail: valerid@rutenia.ru

Поступила в редакцию 28.06.2010 г.

РЕФЕРАТ Разработана оригинальная тест-система для скрининга ингибиторов серин-треониновых протеинкиназ на основе штамма *Escherichia coli* APHVIII/Pk25. Фосфорилирование протеинкиназами фермента аминокликозидфосфотрансферазы VIII (APHVIII), инактивирующего аминокликозидные антибиотики, увеличивает устойчивость бактерий к антибиотику канамицину. Ингибиторы протеинкиназ, напротив, снижают устойчивость клеток бактерий к канамицину. Получены модификации APHVIII, в которых сайт фосфорилирования Ser-146, фосфорилируемый киназой Pk25, изменен в соответствии с канонической последовательностью аутофосфорилирования Pk25 *Streptomyces coelicolor*. Модифицированные и исходный гены *aphVIII* клонированы в *E. coli* одновременно с геном, кодирующим каталитический домен *pk25*. При экспрессии этих генов в клетках происходит накопление кодируемых ими белков. Выделенный каталитический домен Pk25 сохраняет киназную активность полноразмерной протеинкиназы. Варианты *E. coli*, содержащие одновременно гены *aphVIII* и *pk25*, более устойчивы к канамицину, чем варианты, несущие только ген *aphVIII*. Ингибиторы протеинкиназ класса индолилмалеимидов подавляют активность Pk25 и понижают устойчивость клеток к канамицину. Моделирование пространственных структур APHVIII и Pk25 показало, что фосфорилируемый в молекуле APHVIII Ser-146 является аналогом фосфосерина в области рибозного кармана протеинкиназ типа PKA, а структура Pk25 подобна структуре PknB *Mycobacterium tuberculosis*. Результаты докинга указывают на взаимодействие эффективных ингибиторов протеинкиназы Pk25 с АТФ-связывающей областью киназы. Разработанная оригинальная тест-система может быть использована для первичного отбора АТФ-конкурентных низкомолекулярных ингибиторов серин-треониновых протеинкиназ бактерий и человека.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА серин-треониновые протеинкиназы, индолилмалеимиды, скрининг ингибиторов протеинкиназ, бактериальная тест-система, *Streptomyces*.

ВВЕДЕНИЕ

Серин-треониновые протеинкиназы (СТПК) – универсальные регуляторы клеточного метаболизма эукариот [1–3]. Им также принадлежат ключевые роли в контроле процессов апоптоза, пролиферации и дифференцировки клеток, транспорта веществ из клетки и др. Нарушение функционирования киназ ассоциировано с развитием многих заболеваний человека, таких, как диабет [4], шизофрения [5], сердечно-сосудистые расстройства [6], а также

с патологическими состояниями, например канцерогенезом [7] и нарушением иммунитета [8]. В последние десятилетия интенсивное развитие получил биоминьен-направленный поиск модуляторов (ингибиторов) протеинкиназ как потенциальных лекарственных препаратов нового поколения [9–11].

Серин-треониновые протеинкиназы эукариотического типа обнаружены у бактерий, включая патогенные для человека [12]. Установлено, что СТПК участвуют в формировании вирулентности, бакте-

риальных биопленок, поддержании толерантности, персистенции патогенных микроорганизмов. Показано ключевое значение СТПК в формировании вирулентности *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и ряда других патогенных бактерий [12–14]. Установлено их участие в модуляции устойчивости к антибиотикам у *M. tuberculosis* [15]. В последнее время ведется интенсивная работа по скринингу ингибиторов СТПК [16–19].

Ранее нами была разработана тест-система [20] для первичного скрининга (прескрининга) ингибиторов СТПК на основе сконструированного штамма *Streptomyces lividans* TK24 (66) АРНVIII+, ключевым элементом которой является фермент, инактивирующий аминогликозидные антибиотики, – аминогликозидфосфотрансфераза типа VIII (АРНVIII). Ген *aphVIII*, выделенный из генома *Streptomyces rimosus*, был клонирован и экспрессирован в *S. lividans* TK24 (66). Важной особенностью АРНVIII *S. rimosus* является зависимость активности фермента от уровня его фосфорилирования эндогенными СТПК [21]. Фосфорилирование фермента АРНVIII придает клеткам *Streptomyces* устойчивость к аминогликозидным антибиотикам. Ингибиторы СТПК препятствуют фосфорилированию и делают клетку более чувствительной к аминогликозидам [20]. Такая система изменения чувствительности клеток к аминогликозидам в присутствии ингибиторов СТПК позволяет вести первичный отбор ингибиторов этих СТПК. В геноме *S. coelicolor* A3(2) NC_003888, близкородственном штамму *S. lividans* TK24 (66) ACEY01000000, идентифицированы и аннотированы 34 СТПК. Как минимум одна из них – протеинкиназа Pk25 (код доступа NCBI Reference Sequence: Protein NP_628936.1) – способна фосфорилировать АРНVIII [22]. Для исключения неспецифического действия ингибиторов на другие СТПК *S. lividans* TK24 (66), предположительно способные фосфорилировать АРНVIII, сконструирована и описана в данной работе тест-система на основе фермента АРНVIII и каталитического домена протеинкиназы Pk25 в штамме *Escherichia coli*. Отсутствие в геноме *E. coli* собственных генов СТПК эукариотического типа делает тест-систему более чувствительной и позволяет отбирать ингибиторы, специфичные в отношении только Pk25 и ее близких гомологов [23].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Штаммы: *S. coelicolor* A3(2) (ВКПМ, г. Москва), *S. lividans* TK24 (66) АРНVIII+ (код доступа в GenBank ACEY01000000), *E. coli* DH5a: F⁻, Ф 80 ΔlacZΔM15, Δ(lacZYA-argF), U169 (Promega); BL21(DE3): F⁻, dcm, ompT, hsdS(r_B⁻m_B⁻), galλ(DE3) (Novagen).

Плазмидные векторы: pET16b, pET22b и pET32a (Novagen).

Среды. Для выращивания штаммов *S. coelicolor* A3(2) и *S. lividans* TK24 (66) использовали среды YSP и YEME [24]. Для выращивания *E. coli* использовали среду Лурия (L-бульон), NZCYM, M9-среду с 1.5% глицерина (на 1 л): 6 г Na₂HPO₄, 3 г KH₂PO₄, 0.5 г NaCl, 1 г NH₄Cl, pH 7.4, 2 мл 1 М MgSO₄, 15 мл глицерина. Для обеспечения селективного роста плазмидсодержащих клеток добавляли ампициллин (100 мкг/мл). Для экспрессии белка использовали индуктор IPTG в концентрации 1 мМ.

Процедуры молекулярного клонирования. Выделение тотальной ДНК штаммов *S. coelicolor* A3(2) и *S. lividans* TK24 (66) АРНVIII проводили согласно руководству [24]. Выделение плазмидной ДНК, приготовление компетентной культуры *E. coli*, трансформацию и анализ рекомбинантных плазмид проводили с использованием стандартных методов [25]. Амплификацию ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) проводили с использованием набора «Амплификация» фирмы “Dialat Ltd.” на приборе Терцик ТП4-ПЦР01 (ДНК-Технология). Температурный режим подбирали с учетом длины и состава праймеров. Олигонуклеотиды синтезированы фирмой «Синтол». Они представлены в табл. 1. Нуклеотидную последовательность ДНК определяли по методу Сэнгера. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программы BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

Электрофорез белков проводили в 12% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях как описано ранее [21]. Для этого клетки, содержащие сконструированные плазмиды, выращивали в жидкой среде NZCYM, содержащей ампициллин (150 мкг/мл) при 34°C до оптической плотности 0.6 (~1.5 ч), затем индуцировали экспрессию каталитического домена киназы добавлением IPTG до финальной концентрации 1 мМ. Далее проводили культивирование при 28°C в течение 4 ч, отбирали биомассу, которую суспендировали в буфере: 62.5 мМ Трис-НСl, pH 6.8; 5% глицерин; 2% меркаптоэтанол; 0.1% SDS; бромфеноловый синий. Клетки разрушали кипячением в течение 10 мин в буфере и анализировали белки электрофорезом в полиакриламидном геле. В ячейки геля вносили по 25 мкг суммарного белка фракции. Электрофореграммы белков сканировали на лазерном денситометре Ultrosan 2205 LKB. В качестве контроля использовали фракцию белков штамма *E. coli* BL21(DE3), содержащего вектор без вставки.

Выделение белка клонированного в *E. coli* каталитического домена протеинкиназы Pk25. Клетки *E. coli* разрушали двукратной обработкой ультразвуком в буфере, содержащем 20 мМ Трис-НСl, pH

Таблица 1. Праймеры, использованные в работе*

Название	Сайты рестрикции	Структуры праймеров 5'–3'
Pk25EN	EcoRI	ATCCGAATTATGGCACGGAAGATCGGCAG
Pk25C	HindIII	CCGCAAGCTTGGTGCCGTTGCCGGAACCG
Pk25CN	NdeI	TCGTCATATGCGTTACCGGCTCCATGAGCGGC
Pk25CC	HindIII	CCGCAAGCTTCATCCGCTGGGCCGACGCCG
Pk25NBgl	Bgl II	TTTTAGATCTAATAAGGAGATATACATGTACCGGCTCCATGAGCGGCT RBS начало кат. домена pk25
Pk25CBgl	Bgl II	CCG CAG ATC TAT CCG CTG GGC CGA CGC CGC
T7prom	—	TTAATACGACTCACTATAGG
T7term	—	CTAGTTATTGCTCAGCGG
APH 146-1(+)	—	GCTGTCGCTACAGGGACGGTCACTTGGAGGATCTGGAC
APH 146-1(-)	—	GTCCAGATCCTCCAAGCTGACCGTCCCTGTAGCGACAGC
APH 146-2(+)	—	GCTGTCGCTACAGGGAGCGTCACTTGTTCGGATCTGGACGAG
APH 146-2(-)	—	CTCGTCCAGATCCGACAAGGTGACGCTCCCTGTAGCGACAGC
APH 146-T(+)	—	GTCGCTGAAGGGACCGTTCGACTTGGAG
APH 146-T(-)	—	CTCCAAGTCGACCGTCCCTTCAGCGAC
AphN	NdeI	TTTTCATATGGACGATGCGTTGCGTGC
AphC	BamHI	TTTTGGATCCTCAGAAGAAGTCTCCAAAC

*Сайты узнавания рестриктазами выделены жирным шрифтом, нуклеотидные замены – однократным подчеркиванием.

7.8, 10 мМ 2-меркаптоэтанола, 300 мМ NaCl и 1 мМ ФМСФ, или в этом же буфере, содержащем дополнительно 8 М мочевины. Нерастворимый материал удаляли центрифугированием при 20000 *g* в течение 20 мин. Фракции растворенных белков *E. coli* наносили на колонки с Ni-NTA-агарозой (Qiagen), интенсивно промывали смолу буфером того же состава, содержащим дополнительно 50 мМ имидазола, pH 6.0, и элюировали адсорбированный белок, пропуская через колонки соответствующий буфер (без мочевины – для нативного растворимого белка и с мочевиной – для денатурированного нерастворимого белка) с градиентом концентрации имидазола 0.05–0.5 М [20]. Белки в элюате анализировали SDS-PAGE.

Анализ аутофосфорилирования выделенного белка каталитического домена Pk25 *in situ* проводили после разделения выделенного белка электрофорезом в денатурирующих условиях. Для ренатурации протеинкиназы в геле использовали процедуру Камешита и Фуджисава [26]. Гель с включенным в него белком интенсивно промывали для удаления SDS 50 мМ Трис-НСl, pH 7.8 с 25% 2-пропанолом и 8 М мочевиной. Далее проводили ренатурацию белка, удаляя денатуранты промыванием геля последовательно буферами А: 50 мМ Трис-НСl, pH 7.8, и Б: 50 мМ Трис-НСl, pH 7.8, 100 мМ NaCl, 6 мМ 2-меркаптоэтанола, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ CaCl₂. Затем гель инкубировали в присутствии 50 мкКи/мл [γ -³²P]АТФ

(7000 Ки/мМ, «Фосфор», РФ) в буфере Б для анализа протеинкиназной активности [21]. Белок в геле фиксировали и окрашивали в 40% ТХУ, отмывали от ТХУ и непрореагировавшей метки 5% уксусной кислотой, высушивали и ауторадиографировали, экспонируя с рентгеновской пленкой Kodak X-Omat AR.

Процедура клонирования в экспрессионные векторы pET32a, pET22b и pET16b. Клонирование гена протеинкиназы *pk25* штамма *S. coelicolor* A3(2) и аналогичного гена штамма *S. lividans* TK24 (66) в *E. coli* проводили в составе экспрессионного вектора pET32a по сайтам EcoRI и HindIII (праймеры Pk25EN и Pk25C) (табл. 1). Клонирование каталитического домена протеинкиназы *pk25* штамма *S. coelicolor* A3(2) в *E. coli* проводили в составе экспрессионного вектора pET22b по сайтам NdeI и HindIII (праймеры Pk25CN и Pk25CC). Клонирование модифицированного гена *aphVIII* в *E. coli* осуществляли в составе экспрессионного вектора pET16b по сайтам NdeI и XhoI (праймеры AphN и AphC). Клонирование каталитического домена протеинкиназы *pk25* штамма *S. coelicolor* A3(2) в *E. coli* осуществляли в составе экспрессионных векторов pET16b + *aphVIII146-S* с немодифицированным сайтом фосфорилирования APHVIII, pET16b + *aphVIII146-1*, pET16b + *aphVIII146-2*, pET16b + *aphVIII146-3* – с модифицированными сайтами по рестрикционному сайту BamHI (праймеры Pk25NBgl и Pk25CBgl).

Клонирование нуклеотидной последовательности каталитического домена протеинкиназы *pk25* проводили в составе экспрессионного вектора pET22b по сайтам NdeI–HindIII (праймеры Pk25CN, гомологичный N-концевой области каталитического домена, и Pk25CC, гомологичный C-концевой области каталитического домена). Для наработки фрагмента проводилась амплификация с тотальной ДНК *S. coelicolor*. Фрагмент ДНК, соответствующий каталитическому домену гена протеинкиназы *pk25*, препаративно выделяли из агарозного геля, секвенировали и клонировали в составе плазмиды pET22b по сайтам эндонуклеаз рестрикции NdeI и HindIII. Полученной лигазной смесью трансформировали штамм *E. coli* DH5a. Скрининг рекомбинантных клонов осуществляли при помощи ПЦР с использованием стандартных праймеров T7prom и T7term. Из отобранных трансформантов выделяли плазмидные ДНК и проводили повторное секвенирование или рестрикционный анализ гибридных плазмид на наличие вставки. Далее полученными плазмидами pET22b-*pk25* трансформировали штамм *E. coli* BL21(DE3).

Сайт-направленный мутагенез области Ser-146 аминокликозидфосфотрансферазы APHVIII. Для проведения сайт-направленного мутагенеза использован метод точковых мутаций Нельсона [27]. Для получения мутантного варианта 1 (аминокислотные замены: Ser-146→Thr-146, Glu-144→Thr-144, Asp-148→Ser-148) синтезированы праймеры APH 146-1(+) и APH 146-1(-) (табл. 1), предусматривающие данные замены. Для получения мутантного варианта 2 (замены Glu-144→Thr-144, Asp-148→Ser-148, Glu-150→Ser-150) синтезированы праймеры APH146-2(+) и APH146-2(-). Вариант 3 представляет собой замену Ser-146→Thr-146, проведенную с помощью синтезированных праймеров APH146-T(+) и APH146-T(-).

В качестве внешних праймеров использовались AphN и AphC, соответствующие 5'- и 3'-концевым фрагментам структурной части гена *aphVIII*.

Полученные в результате проведенного мутагенеза фрагменты секвенировали для подтверждения соответствующих нуклеотидных замен, после чего клонировали в составе мультикопийного вектора pET16b под контроль транскрипционного и трансляционного сигналов бактериофага T7 в рамке считывания с ATG экспрессионного участка по сайтам эндонуклеаз рестрикции NdeI и BamHI с последующей трансформацией штамма *E. coli* DH5a. Скрининг рекомбинантных клонов осуществляли при помощи ПЦР с использованием праймеров T7prom и T7term. Из отобранных трансформантов выделяли плазмидные ДНК и ресеквенировали полученные мутантные гены.

Определение уровня устойчивости к канамицину отобранных трансформантов *E. coli* BL21(DE3).

Для анализа использовали клоны трансформантов *E. coli* BL21(DE3), содержащие гены исходной либо модифицированной *aphVIII* или *aphVIII* и *pk25* в составе вектора pET16b. С помощью репликатора клоны трансформантов, устойчивые к ампициллину в концентрации 100 мкг/мл, переносили на чашки Петри с LB-средой, содержащей различные концентрации аминокликозидного антибиотика канамицина и индуктор IPTG, и фиксировали рост колоний через 25 ч культивирования при 37°C.

Определение активности ингибиторов протеинкиназ на бактериальной тест-системе. Для определения активности ингибиторов использовался метод бумажных дисков. Методика заключалась в определении величины зоны подавления роста штамма, засеянного газонем на агаризованной среде, вокруг бумажных дисков, содержащих антибиотик или антибиотик в сочетании с ингибиторами серинтреониновых протеинкиназ. Тест-система: *E. coli* BL21(DE3)APHVIII/Pk25. Бактерии, выращенные на агаризованной LB-среде с ампициллином, смывали в жидкую LB-среду и выращивали в течение ночи при 37°C. Клетки центрифугировали (4000 об/мин, 10 мин). Осадок ресуспендировали в жидкой среде M9. Бактериальную суспензию смешивали с содержащей ампициллин и индуктор IPTG расплавленной агаризованной средой M9, в соотношении 1 : 1 (v/v) и заливали полученной смесью чашки Петри с агаризованной средой M9 с ампициллином и IPTG. Ампициллин необходим для поддержания плазмиды в штаммах *E. coli*. На поверхность агара накладывали бумажные диски, содержащие антибиотик канамицин или антибиотик и ингибитор протеинкиназ. Культуру инкубировали в течение 16 ч при 37°C.

Моделирование структуры каталитического домена Pk25. В качестве шаблонов для построения модели структуры каталитического домена Pk25 были использованы рентгеноструктурные данные по киназе PknB *M. tuberculosis* (коды доступа в банке белковых структур PDB [28]: 1MRU [29], 1O6Y [30], 2FUM [31], 3F61 [32], 3F69 [32]). Аминокислотные последовательности шаблонных белков были извлечены непосредственно из структурных файлов, последовательность Pk25 *S. coelicolor* A3(2) была получена из GenBank (код доступа 21223157 [33]); аннотирование каталитического домена было осуществлено на основании гомологии. Выравнивание аминокислотных последовательностей осуществляли с помощью программы ClustalX 2.0.11 [34]. Моделирование осуществляли с помощью программы Modeller 9v5 [35]. Генерировали 35 различных моделей каталитических доменов, каждую из которых оптимизировали методом моделирования отжига. Лучшую модель выбирали на основе оценочной функции DOPE,

реализованной в Modeller, и валидации программой PROCHECK [36]. Дальнейшую оптимизацию модели проводили в программном комплексе SYBYL 8.0 [37]: к моделям добавляли все требуемые атомы водорода и проводили 150 шагов минимизации энергии в силовом поле Tripos [38] методом Пауэлла.

Моделирование структуры каталитического домена АРНVIII. Для моделирования структуры каталитического домена аминокликозидфосфотрансферазы VIII дикого типа и ее мутантных вариантов была использована структура комплекса наиболее гомологичного белка АРН(3')-IIa (код доступа 1ND4 [39], идентичность аминокислотной последовательности 36%) с канамицином. Методология моделирования аналогична описанной выше за тем исключением, что в каждом случае строили 50 моделей.

Докинг ингибиторов в модель структуры киназы Pk25 проводили с использованием программы Autodock 4.1 [40]. Структуры ингибиторов были сгенерированы с помощью средств программного комплекса SYBYL 8.0 и оптимизированы в силовом поле MMFF94 [41]. Подготовку к докингу осуществляли в программном комплексе MGLTools 1.5.4 [42] в соответствии с общепринятыми рекомендациями. Построение решеточных полей и докинг осуществляли с использованием параметров по умолчанию; расположение решетки для расчета потенциала лиганд-рецепторного взаимодействия выбирали таким образом, чтобы она включала в себя все важнейшие аминокислотные остатки области связывания АТФ. При докинге каждого лиганда поиск с помощью генетического алгоритма запускали 100 раз; результаты докинга группировали в кластеры, используя пороговое значение среднеквадратичного отклонения, равное 2.0 Å. Анализ результатов докинга проводили с помощью MGLTools 1.5.4.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Клонирование и сравнение полноразмерного гена серин-треониновой протеинкиназы *pK25 S. coelicolor* и *pK25 S. lividans*

В секвенированной нуклеотидной последовательности генома *S. lividans* TK24 ACEY01000000 ген протеинкиназы, гомологичный гену *pK25 S. coelicolor* на 99.8%, отличается шестью нуклеотидами, в том числе содержит вставку – С(664). Наличие вставки ведет за собой сдвиг рамки считывания в аминокислотной последовательности каталитического домена. Для сравнения интересующих нас протеинкиназ, имеющих в нашей коллекции штаммов *S. coelicolor* A3(2) и *S. lividans* TK24 (66), было проведено клонирование и секвенирование генов этих протеинкиназ. Для выделения генов *pK25* серин-треониновых протеинкиназ из геномов *S. coelicolor* и *S. lividans* были

синтезированы два олигонуклеотида (Pk25EN, гомологичный проксимальной (N-концевой) области значащей части цепи гена; Pk25C, комплементарный дистальной части (C-концевой) значащей цепи гена), содержащие в своем составе сайты рестрикции HindIII и EcoRI (табл. 1). В результате амплификации с тотальной ДНК *S. coelicolor* и *S. lividans* были наработаны заданные ДНК-фрагменты и клонированы в составе экспрессионного вектора pET32a по сайтам эндонуклеаз рестрикции HindIII и EcoRI в штамм *E. coli* DH5a. Секвенированием и анализом ДНК-фрагментов их идентифицировали как *pK25*. При сравнении генов *S. coelicolor* и *S. lividans* найдены нуклеотидные замены в позициях 123, 237, 279, 435, 963 от первого кодона atg структурной области гена *pK25 S. lividans*. Данные замены не приводят к заменам аминокислот в белковой последовательности. Таким образом, аминокислотные последовательности полноразмерного продукта гена *pK25 S. coelicolor* и *S. lividans* являются идентичными.

Клонирование и экспрессия нуклеотидной последовательности каталитического домена протеинкиназы Pk25 штамма *S. coelicolor* в экспрессионный вектор pET22b

Для клонирования были синтезированы два олигонуклеотида (Pk25CN, Pk25CC), которые содержали в своем составе сайты для рестриктаз NdeI и HindIII (табл. 1). Полученный в результате амплификации фрагмент рестрицировали и клонировали в *E. coli* DH5a в составе экспрессионного вектора pET22b. После ресеквенирования сконструированными векторами трансформировали экспрессионный штамм *E. coli* BL21(DE3).

Для изучения экспрессии нуклеотидной последовательности каталитического домена протеинкиназы в клетках отобранных трансформантов *E. coli* проводили гель-электрофорез растворимой фракции клеточных белков в денатурирующих условиях. В качестве контроля использовали фракцию белков из клеток штамма *E. coli* BL21(DE3) pET22b. В клетках *E. coli*, содержащих плазмиду pET22b-Pk25 с последовательностью каталитического домена *pK25*, наблюдалась единственная по сравнению с контрольными клетками (клетки *E. coli*, содержащие плазмиду pET22b, но без последовательности каталитического домена *pK25*) дополнительная фракция белка с молекулярной массой около 28 кДа (рис. 1а). Эта величина соответствует расчетной молекулярной массе (27.8 кДа) каталитического домена протеинкиназы Pk25 штамма *S. coelicolor* A3(2). По данным сканирования, содержание белка в дополнительной фракции составляет до 3.5% от суммарного белка.

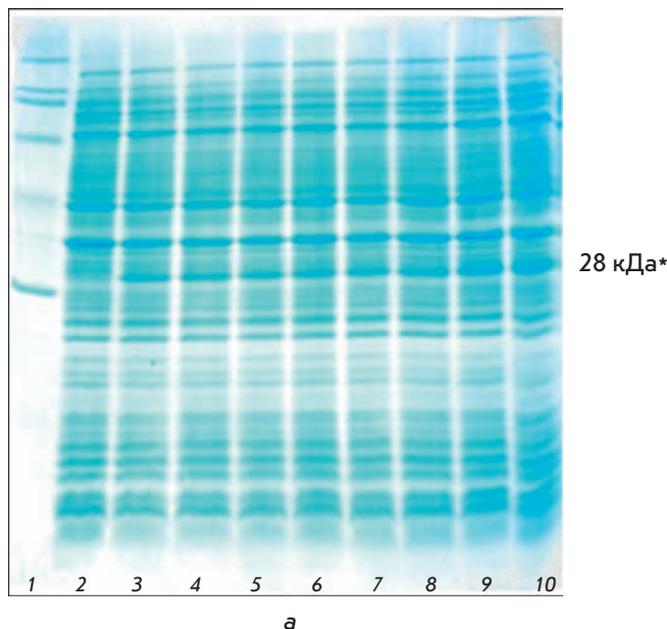


Рис. 1. а – Электрофорез растворимой фракции белков штамма *E. coli* BL21(DE3). 1 – маркеры, 2 – контроль (фракция белков из клеток штамма *E. coli* BL21(DE3) pET22b), 3–10 – клоны *E. coli*, содержащие плазмиду pET22b-pk25. (* – белковая фракция, соответствующая каталитическому домену Pk25). б – Электрофорез изолированного каталитического домена Pk25 *S. coelicolor* в полиакриламидном геле. 1 – ауторадиограмма самофосфорилированного в геле каталитического домена, 2 – окраска Кумасси.

Моделирование пространственной структуры каталитического домена Pk25

Основные структурные особенности киназы Pk25 отражены в модели. Модель близка к структуре шаблона PknB *M. tuberculosis* в силу значительной степени идентичности последовательностей (рис. 2а). Суммарный заряд аминокислот каталитического домена равен -3. Наиболее заметные различия между структурами модели и шаблона наблюдаются в области спирали С (вставка четырех аминокислотных остатков в Pk25), в петле между фрагментами $\beta 4$ и $\beta 5$ (делеция четырех аминокислотных остатков в Pk25) и в области спирали $\eta 3$ (делеция пяти аминокислотных остатков в Pk25). Конформация активационной петли отличается от шаблона вследствие высокой подвижности петли. Тем не менее, указанные различия не влияют на конформацию аминокислотных остатков в центре связывания АТФ. Пять аминокислотных остатков АТФ-связывающего кармана Pk25 отличаются от соответствующих остатков PknB (рис. 2б): V72I, I90M, Y94L, M145L, M155T (нумерация в соответствии с последовательностью PknB). Первые три замены относительно консервативны и не должны оказывать решающего влияния на процесс взаимодействия с ингибитором. Замена Y94L находится в области шарнира, и лиганды взаимодействуют с атомами основной цепи данного остатка, а не с его боковой цепью. Две последние замены не консервативны и должны оказывать влияние на взаимодействие с ингибиторами; в частности, обе замены приводят к увеличению доступного объема кармана связывания. Наконец, благодаря введению

остатка треонина в позицию 155 в этой области появляется дополнительная гидроксильная группа.

Анализ аутофосфорилирования в активационной петле каталитического домена Pk25

Белковую фракцию каталитического домена Pk25, клонированного и экспрессированного в *E. coli*, выделяли из лизата бактерий хроматографией на гистидинсвязывающей смоле в нативных условиях или в присутствии 8 М мочевины и после электрофоретического разделения анализировали его внутриклеточную локализацию и способность к аутофосфорилированию *in situ*. Было показано, что во фракции солерастворимых белков клетки каталитический домен Pk25 отсутствует. Этот рекомбинантный белок локализуется во фракции нерастворимых белков клетки и может быть переведен в растворимое состояние в присутствии мочевины, что и было проделано. После электрофоретического разделения значение молекулярной массы анализируемого фрагмента составляет 28 кДа, что хорошо совпадает с расчетным значением для клонированного домена. В присутствии $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$ белок включает в свой состав меченый фосфат (рис. 1б). Анализ фосфорилирования после разделения белков в геле позволяет исключить интерферирующее влияние возможных примесей на результаты. В целом, полученные данные указывают на то, что выделенный белок каталитического домена Pk25 является ферментативно активным и способен к аутофосфорилированию. Локализация каталитического домена Pk25-киназы во фракции

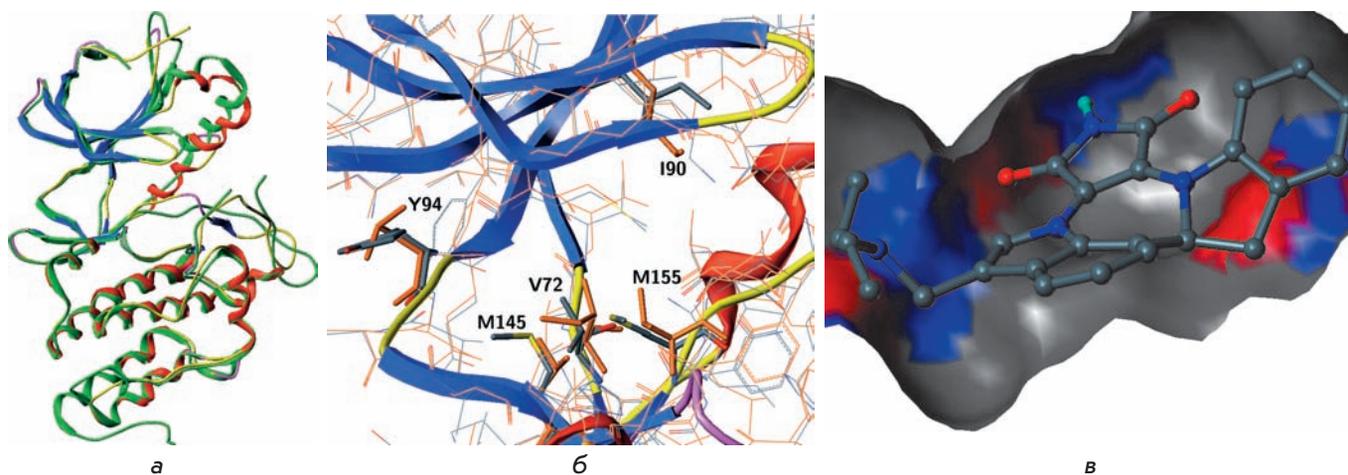
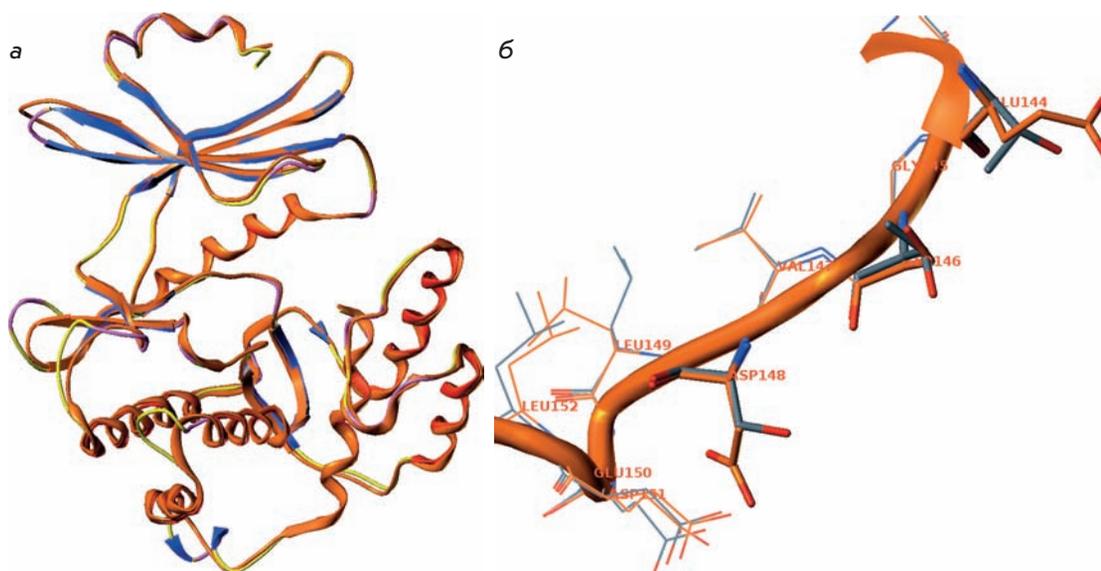


Рис. 2. Модель пространственной структуры Pk25. а – Сопоставление структур шаблонного белка PknB *M. tuberculosis* (зеленый) и Pk25 (окрашена по типам вторичной структуры). б – Карман связывания АТФ в PknB (окрашен по типам атомов) и Pk25 (оранжевый), отмечены неконсервативные аминокислотные остатки. в – Способ связывания LSTA-1425 с киназой Pk25. Ван-дер-ваальсова поверхность киназы окрашена согласно донорно-акцепторным свойствам (красный — донор водородной связи, синий — акцептор).

Рис. 3. Модель пространственной структуры APHVIII. а – Сопоставление структуры APH(3')-IIa (код доступа 1ND4, оранжевый) и модели APHVIII (окрашена по типам вторичной структуры). б – Аминокислотные остатки в активационной петле APHVIII дикого типа (атомы углерода оранжевые) и мутанта 146-1 (атомы углерода серые).



нерастворимых белков клетки не противоречит возможности его аутофосфорилирования в ходе экспрессии, а также не исключает его активности в отношении растворимых и нерастворимых белков. Эти результаты совпадают с аналогичными данными для каталитических доменов протеинкиназ *Streptomyces* и *Mycobacterium* [43–45]. Установлено, что фосфорилирование происходит в активационной петле СТПК по серину. Анализ специфичности фосфорилирования субстратов СТПК *M. tuberculosis* показал, что с наибольшей эффективностью осуществляется фосфорилирование участков, аналогичных сайтам аутофосфорилирования исследуемой протеинкиназы [46].

Моделирование пространственной структуры аминокликозидфосфотрансферазы VIII

Модель структуры каталитического домена APHVIII близка к структуре шаблонного белка APH(3')-IIa (рис. 3а). Наибольшее подобие структур достигается в областях связывания АТФ и канамицина, а также в активационной петле; небольшие вставки в APHVIII по сравнению с аминокислотной последовательностью шаблона располагаются в структурно неконсервативных областях петель между различными элементами вторичной структуры белка и не вносят решающего вклада в укладку его основной цепи. Физико-химические свойства и конформации критически важных аминокислотных остатков,

Таблица 2. Модификации сайта фосфорилирования Ser-146 APHVIII

Исходные ферменты и модифицированные варианты APHVIII	Сайты фосфорилирования и их модификации*
Pk25	ATTLTESGSFVG
APHVIII	AVAEGS ₁₄₆ VDLED
APHVIII146-1	AVATGT ₁₄₆ VSLLED
APHVIII146-2	AVATGS ₁₄₆ VSLSD
APHVIII146-3	AVAEGT ₁₄₆ VDLED
APHVIII146-4	AVAEGA ₁₄₆ VDLED

*Получившиеся в результате модификаций аминокислотные замены выделены подчеркиванием.

образующих области связывания канамицина и АТФ, также совпадают в шаблоне и модели. Структура мутанта APHVIII146-1 почти полностью совпадает со структурой фермента дикого типа. Различия наблюдаются лишь в области активационной петли и мало влияют на глобальную конформацию (рис. 3б).

Сайт фосфорилирования APHVIII – аминокислотный остаток (Ser-146) – аналог фосфосерина в области, гомологичной рибозному карману серин-треониновых протеинкиназ типа РКА [47]. При моделировании молекулярной динамики нефосфорилированной по Ser-146 APHVIII в комплексе с канамицином (с АТФ и двумя связанными ионами Mg²⁺) были выявлены существенные изменения в структуре фермента, характеризующие ослаблением контакта между N- и C-концевыми доменами [48, 49].

Модификация области S-146 аминокликозидфосфотрансферазы APHVIII – сайта фосфорилирования киназой Pk25

Сайт аутофосфорилирования в активационной петле Pk25 был определен путем сравнения с соответствующим районом PknB *M. tuberculosis* [50]:

PknB DFGI ARAIAD **SGNSVTQTA**AVGTAQYLSPE
Pk25 DFGV AQVAGA **TTLTESGSFV**GSPEYTAPE

Для оптимизации конструкции тест-системы *E. coli* APHVIII/Pk25 мы провели модификацию потенциального сайта фосфорилирования AVAEGS₁₄₆VDLED в активационной петле APHVIII. Целью было приблизить сайт Ser-146 APHVIII по своей структуре к сайту аутофосфорилирования Pk25 TTLTESGSFVG. Для этого проведены модификации окружения Ser-146 фермента APHVIII (табл. 2), предусматривающие аминокислотные замены, выделенные подчеркиванием. Полученные мутантные варианты гена *aphVIII146-1*, *aphVIII146-2*, *aphVIII146-3*, *aph-*

VIII146-4 лигировали в плазмидный вектор pET16b по сайтам рестрикции NdeI–BamHI и клонировали в штамм *E. coli* DH5a. После ресеквенирования полученными плазмидами pET16baphVIIIм1 (рис. 4а) трансформировали штамм *E. coli* BL21(DE3). Для изучения экспрессии белка в клетках *E. coli* всех вариантов APHVIII проводили гель-электрофорез растворимой фракции клеточных белков в денатурирующих условиях.

В клетках *E. coli*, содержащих плазмиду pET-16baphVIII, экспрессировался белок одинаковой молекулярной массы – около 31 кДа. Эта величина соответствует расчетной молекулярной массе белка APHVIII, равной 31.5 кДа.

Создание конструкции, содержащей гены аминокликозидфосфотрансферазы *aphVIII* и протеинкиназы *pk25*

Аmplификацию *pk25* проводили с праймеров Pk25N-BglI и Pk25CBglI (табл. 1) с ДНК плазмидного вектора pET22b-pk25. Праймер Pk25NBglI содержит сайт связывания с рибосомой (RBS) и кодон ATG для нуклеотидной последовательности каталитического домена протеинкиназы Pk25. В плазмидные векторы pET16baphVIIIм1, содержащие описанные ранее варианты *aphVIII*, по сайту BamHI лигировали амплифицированную и рестрицированную по сайту BglII последовательность *pk25*. Отбор клонов проводили в два этапа. На первом этапе отбирали целевые клоны со вставкой путем амплификации со стандартных векторных праймеров: T7promoter primer и T7terminator primer по величине вставки. На втором этапе отбирали клоны с требуемой ориентацией фрагментов амплификацией с праймеров *AphN* и Pk25CC (табл. 1) по наличию и величине вставки. После перекрестного ресеквенирования, полученными плазмидами pET16APC (рис. 4б) трансформировали штамм *E. coli* BL21(DE3). В индуцирующих

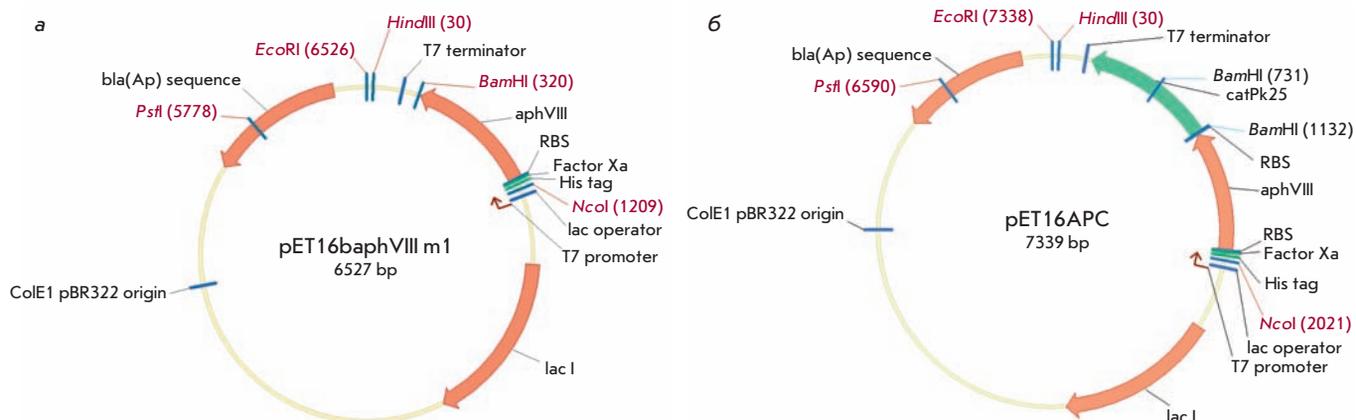


Рис. 4. Векторные конструкции. а – Вектор pET16baphVIII m1 с мутантными вариантами *aphVIII146-1*, *aphVIII146-2*, *aphVIII146-3*, *aphVIII146-4* и исходным *aphVIII146-5*. б – Векторные конструкции, включающие *pk25* и модифицированные *aphVIII*: *aphVIII146-1*, *aphVIII146-2*, *aphVIII146-3*, *aphVIII146-5*.

условиях проверяли экспрессию генов *aphVIII* и *pk25* гель-электрофорезом. В первых четырех вариантах (рис. 5) (дорожки 2–5) видны дополнительные фракции белка АРНVIII, на следующей дорожке (6) – дополнительная фракция Pk25, на последних четырех дорожках (7–10) – белковые фракции с молекулярными массами 31,5 кДа, что соответствует АРНVIII, и 28 кДа, что соответствует Pk25. Для уточнения результатов было проведено масс-спектрометрическое исследование дополнительных белковых фракций

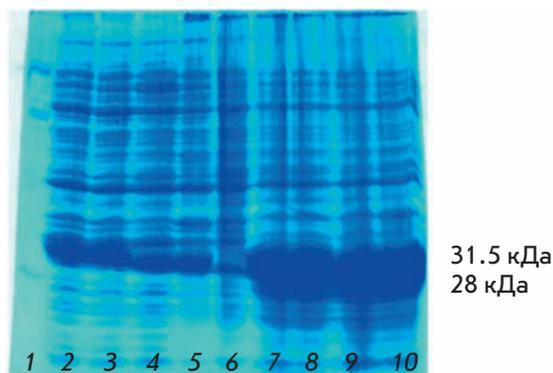


Рис. 5. Электрофореграмма белков штамма *E. coli* BL21(DE3), каталитического домена Pk25, АРНVIII. 1 – белковый маркер, 2 – фракция АРНVIII146-S (исходный), 3 – фракция АРНVIII146-1, 4 – фракция АРНVIII146-2, 5 – фракция АРНVIII146-3, 6 – каталитический домен Pk25 (Pk25), 7 – фракции АРНVIII146-S/ Pk25, 8 – фракции АРНVIII146-1/Pk25, 9 – фракции АРНVIII146-2/Pk25, 10 – фракции АРНVIII146-3/Pk25. В качестве контролей анализировали фракции белков из клеток штамма *E. coli* BL21(DE3), содержащих плазмиду pET22b/pk25 и плазмиду pET16baphVIII (исходный вариант).

на дорожке 7. По результатам исследования более тяжелая фракция содержит аминокислотную последовательность АРНVIII (gb|AAAY27879.1| aminoglycoside-O-phosphotransferase VIII). Более легкая фракция содержит аминокислотную последовательность, соответствующую каталитическому домену Pk25 (ig|1100219 NP_628936.1 serine/threonine protein kinase *S. coelicolor* A3(2)).

Анализ уровня устойчивости к канамицину вариантов *E. coli* BL21(DE3), содержащих различные модификации гена *aphVIII* и их комбинации с *pk25*

Все созданные конструкции исследованы по уровню устойчивости к аминогликозидному антибиотику канамицину (табл. 3). Штамм BL21(DE3), содержащий плазмиду pET16b с геном *aphVIII* (исходный вариант), был устойчив к канамицину (325 мкг/мл).

Замены, произведенные в варианте АРНVIII146-1, приводили к снижению устойчивости на 48%. У варианта АРНVIII146-2 устойчивость снижалась на 54%. Уровень устойчивости варианта АРНVIII146-3 с заменой Ser-146 на Thr-146 не изменялся. В случае замены Ser-146 на Ala-146 (АРНVIII146-4), т.е. полной инактивации сайта фосфорилирования Ser-146, уровень устойчивости к канамицину падал на 70%. Активность АРНVIII146-4 *in vitro* совпадает с полученными данными, т.е. активность мутантных вариантов составляет около 30% от исходной [51]. Все конструкции АРНVIII с Pk25 обладали более высоким уровнем активности. Уровень устойчивости к канамицину возрастал на 91% в случае с АРНVIII146-1/Pk25, на 83% в случае с АРНVIII146-2/Pk25, на 23% при замене Ser-146 на Thr-146 и в случае с исходной АРНVIII – АРНVIII/Pk25 (табл. 3).



Рис. 6. Бактериальная тест-система *E. coli aphVIII/Pk25* для скрининга ингибиторов серин-треониновых протеинкиназ. **а** – Принцип тест-системы: фосфорилирование APHVIII по Ser-146 Pk25 приводит к устойчивости *E. coli* к канамицину; добавление ингибитора препятствует фосфорилированию и снижает устойчивость к канамицину. **б** – Валидация тест-системы с использованием классических ингибиторов Bis-1 и Bis-5 [52]: добавление Bis-1 приводит к увеличению зоны.

Докинг ингибиторов класса индолилмалеимидов в модель структуры Pk25

На сконструированной ранее тест-системе *S. lividans* APHVIII+ был проведен скрининг соединений различных химических классов: бензодиазинов, бензофталазинов, циклопентендионов, индолилмалеимидов, пиразолов, тиазолов, тиазолтетразинов и др. (неопубликованные данные). Среди индолилмалеимидов было обнаружено значительное число соединений, проявляющих ингибиторную активность по отношению к протеинкиназам, для которых был проведен молекулярный докинг с целью установления предположительного способа связывания. Результаты докинга указывают на возможность взаимодействия между областью связывания АТФ киназы Pk25 и отобранными на сконструированной

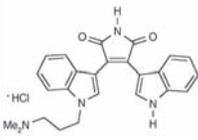
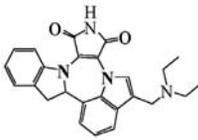
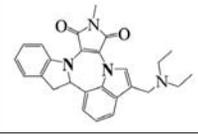
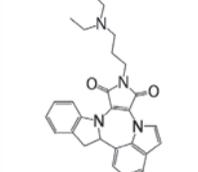
тест-системе *S. lividans* TK24 (66) APHVIII/СТПК ингибиторами: LCTA-1385, LCTA-1398, LCTA-1425 [20], бис-индолилмалеимид-1 [52].

При докинге исследованных в данной работе ингибиторов Pk25 наблюдаются консервативные взаимодействия между малеимидным фрагментом и основной цепью шарнирной области киназы (рис. 2в). Ингибиторы бис-индолилмалеимид-1 (Bis-1) и LCTA-1425 образуют две водородные связи — между карбонильным атомом кислорода малеимидного фрагмента и амидным атомом водорода аминокислотного остатка Val96, а также между имидным атомом водорода малеимидного фрагмента и карбонильным кислородом основной цепи аминокислотного остатка Glu94. У ингибиторов LCTA-1385 и LCTA-1398 имеется лишь первая из названных водородных связей, поскольку

Таблица 3. Уровень устойчивости к канамицину *E. coli* BL21(DE3), содержащей различные варианты APHVIII

Название	Модифицированные конструкции APHVIII	Устойчивость к канамицину вариантов <i>E. coli</i> , мкг/мл	
		APHVIII	APHVIII+Pk25
146-S	AVAEG S ₁₄₆ VDLED	325±5	400±10
146-1	AVATGT ₁₄₆ VSLED	170±10	325±5
146-2	AVATGS ₁₄₆ VSLSD	150±10	275±10
146-3	AVAEG T ₁₄₆ VDLED	325±5	400±10
146-4	AVAEG A ₁₄₆ VDLED	100±5	-

Таблица 4. Зависимость уровня устойчивости к канамицину *E. coli* APHVIII146-1/Pk25 от действия ингибиторов СТПК

Название известных ингибиторов СТПК класса индолилмалеимидов	Структурная формула ингибитора	Субингибирующая концентрация ингибитора, нмоль/диск	Зона ингибирования в тест-системе <i>E. coli</i> APHVIII146-1/Pk25 при совместном действии Km+ ингибитор, мм
Bis-1		700	13.0
LCTA-1425		125	12.0
LCTA-1398		250	13.0
LCTA-1385		125	12.0

Примечание. Зона ингибирования только канамицином (Km) (5 мг/диск) – 10 мм. Уровень устойчивости к канамицину культуры *E. coli*, содержащей APHVIII146-1 и Pk25, проводили методом бумажных дисков как описано в разделе «Экспериментальная часть». Характеристики индолилмалеимидов серии LCTA, полученных от проф. М.Н. Преображенской, описаны ранее [20].

атом водорода малеимидного фрагмента в них замещен. Как следствие, предсказанная энергия взаимодействия с киназой для двух последних соединений ниже энергии для двух первых на 1 ккал/моль, однако в обоих случаях взаимодействие киназы с ингибитором можно считать выгодным.

Выбор и валидация¹ тест-системы *E. coli* APHVIII/Pk25

Ранее была сконструирована и валидирована [20] тест-система *S. lividans* TK24 (66) APHVIII/СТПК [20]. Регистрируемый эффект данной системы основан на кумулятивном действии антибиотика канамицина и модулятора СТПК в субингибирующей² [20] концентрации, приводящем к появлению или увеличению зоны ингибирования роста индикаторной культуры. Размер зоны отсутствия роста позволял

проводить предварительную оценку эффективности исследуемого ингибитора СТПК [20]. Поэтому принципиально важным при создании новой тест-системы является диапазон изменений уровня устойчивости к канамицину, определяемый различными конструкциями APHVIII. Исходя из этого, вариант APHVIII146-1 является предпочтительным. Поэтому для дальнейших исследований нами выбрана конструкция *E. coli* APHVIII146-1/Pk25 (рис. 6). Для валидации тест-системы *E. coli* APHVIII146-1/Pk25 были использованы ранее описанные ингибиторы СТПК класса индолилмалеимидов: LCTA-1385, LCTA-1398, LCTA-1425 [20] и Bis-1 [52] (табл. 4). В качестве стандартной концентрации канамицина выбрана 5 мг/диск (образуемая зона подавления роста – 10 мм). Все исследованные вещества снижают уровень устойчивости к канамицину. Вещества из библиотеки класса индолилмалеимидов LCTA-1033, LCTA-1196, Bis-5, не проявляющие активности в тест-системе *S. lividans* TK24 (66) APHVIII/СТПК [20], не дали позитивного результата и в тест-системе *E. coli* APHVIII146-1/Pk25, что подтверждает адекватность использованной тест-системы.

¹ Валидация – система последовательно выполняемых проверок и испытаний по доказательству того, что любой материал, процесс, метод, процедура, деятельность, оборудование или механизм могут, будут и позволят достигать ожидаемого результата [53, 54].

² Величина субингибирующей концентрации вдвое меньше величины минимальной ингибирующей концентрации (МИК).

Таблица 5. Лигандсвязывающие аминокислоты аденинсвязывающего кармана серин-треониновых протеинкиназ, бактериальных и *Homo sapiens*

Протеинкиназа	Функции протеинкиназ в патогенезе и физиологии	Аминокислоты аденинсвязывающего кармана	Существенность замен
СТПК бактерий			
Pk25 <i>S. coelicolor</i>	Модуляция устойчивости aph-гена	LVAVMLVLT	Оригинал
PknA <i>M. tuberculosis</i>	Синтез клеточной стенки	┌VAIMLVLT	Несущественна
PknJ <i>M. tuberculosis</i>	Персистенция в хозяине	LVAIMFVLS	»
Stk1 <i>Streptococcus agalactiae</i>	Регулирует клеточную сегрегацию GBS и вирулентность	┌VAIMYVLT	»
StkP <i>S. pneumonia</i>	Фрагмент сигнального пути, вовлеченного в инвазию легких и кровотока	┌VAIMYVLT	»
SP-STK <i>S. pyogenes</i>	Деление клетки, морфология колоний, участие в вирулентности	┌VAIMYVLT	»
RpkA <i>P. aeruginosa</i>	Регуляция экспрессии фактора вирулентности	LVAITMYLLS	Существенна
PknB/Stk1 <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	Регуляция пуринового биосинтеза, аутолизиса, центрального метаболизма	LVAIMYILF	»
PknB <i>M. tuberculosis</i>	Деление клетки, ингибирование слияния лизосом	LVAIMYVMM	»
СТПК <i>Homo sapiens</i>			
PKA <i>H. sapiens</i>	Аллергия, болезни миокарда	LVALMYVLT	Несущественна
CaMK ID <i>H. sapiens</i>	Диабет II типа	LVAIMLVLS	»
Rac2 <i>H. sapiens</i>	Заболевание клеток эпидермиса по действием УФ	┌VAIMYLLT	»
BR kin1 <i>H. sapiens</i>	Регуляция клеточного гомеостаза	LVAV┌HVLA	Существенна
NUAK SNF1-11 <i>H. sapiens</i>	Модуляция фактора TNF-alpha в раковых клетках	LVAIMYALA	»
CaMKII <i>H. sapiens</i>	Индукция долговременной синаптической памяти	LVAIMYALA	»

Примечание. В таблице представлены серин-треониновые протеинкиназы, имеющие не более четырех аминокислотных замен лигандсвязывающей последовательности LVAVMLVLT Pk25. Несущественные аминокислотные замены обозначены (-), существенные замены – (=), замены в области gatekeeper обозначены (┌). Селективность отбираемых ингибиторов по отношению к протеинкиназе определяется сродством лигандов ингибитора к 9 аминокислотам аденинсвязывающего кармана протеинкиназы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Потенциальные возможности использования тест-системы *E. coli* ARHVIII146-1/Pk25 для скрининга ингибиторов СТПК

Сконструированная тест-система может быть использована для первичного отбора (прескрининга) АТФ-конкурентных низкомолекулярных ингибиторов [2], способных диффундировать в агаризованной среде через клеточную стенку *E. coli* и взаимодействовать

с аденинсвязывающим карманом каталитического домена серин-треониновой протеинкиназы Pk25. Селективность отбираемых ингибиторов будет определяться сродством лигандов ингибитора к аминокислотам аденинсвязывающего кармана протеинкиназы. Известно, что идентичность функционально сходных аминокислотных последовательностей позволяет предполагать сходство их пространственной структуры, в том числе лигандсвязывающих карманов, отвечающих за селективность ингибиторов [31, 55].

Сравнение аминокислотных последовательностей каталитического домена Pk25 с каталитическими доменами бактериальных СТПК, в том числе патогенных микроорганизмов с помощью Genomic BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi), позволяет выявить 13 белков с идентичностью более 35%. Среди них присутствуют представители СТПК *Mycobacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*. Аналогичное сравнение с СТПК человека выявляет 19 белков с идентичностью более 30%. Среди них протеинкиназы семейств SAD, BR, NUAК (SNF), DАРК3, PNCK, CaMKII, CaMKI, Zip, PKA, HUNK, PAK2, Mark-PAR1, SIK2, ОРК NimA.

Ингибиторы СТПК, конкурентно замещающие АТФ, присоединяются к аденинсвязывающему карману каталитического домена киназы. Аденинсвязывающий карман состоит из константных и переменных аминокислот. Нами проведена классификация СТПК грамположительных бактерий [23, 56], основанная на физико-химических свойствах боковых цепей девяти переменных аминокислот аденинсвязывающего кармана каталитического домена. В настоящей работе мы использовали этот критерий для выбора СТПК патогенных бактерий и человека, которые могут модулироваться отобранными в предлагаемой тест-системе *E. coli* АРНVIII/Pk25 ингибиторами. В табл. 5 представлены 9 из 13 потенциальных лигандсвязывающих последовательностей СТПК патогенных бактерий и 6 из 19 последовательностей СТПК человека. Критерием отбора служило наличие не более четырех аминокислотных замен

из девяти в положениях переменных аминокислот в аденинсвязывающем кармане Pk25 *S. lividans* (*S. coelicolor*) LVAVMLVLT (табл. 5). Существенными считали замены неполярных аминокислот на полярные в первых четырех и восьмом положениях (обозначено =); все замены, кроме подобной аминокислоты на подобную – в девятом положении (обозначено =), любые замены в пятом положении (gatekeeper) – (обозначено _). Замены в положении 6 (зона шарнира) и 7 менее существенны. Несущественные замены обозначали (-). Наличие от 2 до 4 несущественных замен не изменяет характер взаимодействия ингибиторов с аденинсвязывающей последовательностью протеинкиназы. Поэтому протеинкиназа Pk25 может служить основой для отбора ингибиторов 5 из 13 СТПК патогенных бактерий и 3 из 19 СТПК человека. Критерий структурного сходства аденинсвязывающего кармана является более адекватным, чем процент гомологии белковой последовательности всей протяженности каталитического домена киназы.

Таким образом, сконструированная тест-система может быть использована для прескрининга ингибиторов СТПК ряда патогенных микроорганизмов, например PknA, PknJ *M. tuberculosis*, StkP *S. pneumonia*, SP-STK *S. pyogenes*, а также некоторых СТПК человека, например PKA, CaMKI, Pac2. ●

Работа поддержана Российским фондом
фундаментальных исследований
(грант № 09-04-12025).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Manning G., Whyte D.B., Martinez R., et al. // *Science*. 2002. V. 298. P. 1912–1934.
- Cohen P. // *Nat. Rev. Drug Discov*. 2002. V. 1. P. 309–315.
- Levitzi A. // *Acc. Chem. Res*. 2003. V. 36. P. 462–469.
- D'Alessandris C., Lauro R., Presta I., Sesti G. // *Diabetologia*. 2007. V. 50(4). P. 840–849.
- Barbier E., Zapata A., Oh E., et al. // *Neuropsychopharmacology*. 2007. V. 32(8). P. 1774–1782.
- Shirai H., Autieri M., Eguchi S. // *Curr. Opin Nephrol. Hypertens*. 2007. V. 16(2). P. 111–115.
- Collins I., Workman P. // *Nat. Chem. Biol*. 2006. V. 2. P. 689–700.
- Ishida A., Kameshita I., Sueyoshi N., et al. // *J. Pharmacol. Sci*. 2007. V. 103(1). P. 5–11.
- Goldstein D.M., Gray N.S., Zarrinkar P.P. // *Nat. Rev. Drug Discov*. 2008. V. 7. P. 391–397.
- Bain J., Plater L., Elliott M., et al // *Biochem. J*. 2007. V. 408. P. 297–315.
- Liu Y., Gray N.S. // *Nat. Chem. Biol*. 2006. V. 2. P. 358–364.
- Shi L., Potts M., Kennelly P.J. // *FEMS Microbiol. Rev*. 1998. V. 22. P. 229–253.
- Echenique J., Kadioglu A., Romao S., et al. // *Infect. Immun*. 2004. V. 72(4). P. 2434–2437.
- Cozzone A.J. // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol*. 2005. V. 9. P. 198–213.
- Pérez J., Garcia R., Bach H., et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2006. V. 348(1). P. 6–12.
- Drews S.J., Hung F., Av-Gay Y. // *FEMS Microbiol. Lett*. 2001. V. 205(2). P. 369–374.
- Saini D.K., Tyagi J.S. // *J. Biomol. Screen*. 2005. V. 10(3). P. 215–224.
- Wehenkel A., Bellinzoni M., Graña M., et al. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2008. V. 1784(1). P. 193–202.
- Wączek F., Szabadkai I., Németh G., et al. // *Immunol. Lett*. 2008. V. 116(2). P. 225–231.
- Danilenko V.N., Simonov A.Y., Lakatosh S.A., et al. // *J. Med. Chem*. 2008. V. 51. P. 7731–7736.
- Елизаров С.М., Сергиенко О.В., Сизова И.А. и др. // *Мол. биология*. 2005. Т. 39. С. 1–9.
- Беккер О.Б., Елизаров С.М., Алексеева М.Т. и др. // *Микробиология*. 2008. Т. 77(5). С. 630–638.
- Danilenko V.N., Osolodkin D.I., Lakatosh S.A., et al. // *Current Top. Med. Chemistry*. 2010. *In press*.
- Kieser T., Bibb M.J., Buttner M.J., et al. *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich, John Innes Foundation. England, 2000. P. 613.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning*:

- A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY; Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989.
26. Kameshita I, Fujisawa H. // *Anal. Biochem.* 1989. V. 183. P. 139–143.
27. Nelson R.M., Long G.L. // *Anal. Biochem.* 1989. V. 180. P. 147–151.
28. Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., et al. // *Nucleic Acids Research.* 2000. V. 28. P. 235–242.
29. Young T.A., Delagoutte B., Endrizzi J.A., et al. // *Nat. Struct. Biol.* 2003. V. 10. P. 168–174.
30. Ortiz-Lombardía M., Pompeo F., Boitel B., Alzari P.M. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 13094–13100.
31. Wehenkel A., Fernandez P., Bellinzoni M., et al. // *FEBS Lett.* 2006. V. 580. P. 3018–3022.
32. Mieczkowski C., Iavarone A.T., Alber T. // *EMBO J.* 2008. V. 27. P. 3186–3197.
33. Bentley S.D., Chater K.F., Cerdeno-Tarraga, et al. // *Nature.* 2002. V. 417. P. 141–147.
34. Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P. // *Bioinformatics.* 2007. V. 23. P. 2947–2948.
35. Šali A., Blundell T.L. // *J. Mol. Biol.* 1993. V. 234. P. 779–815.
36. Laskowski R.A., MacArthur M.W., Moss D.S., Thornton J.M. // *J. Appl. Cryst.* 1993. V. 26. P. 283–291.
37. SYBYL 8.0, Tripos International, 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144, USA.
38. Fong D.H., Berghuis A.M. // *EMBO J.* 2002. V. 21. P. 2323–2331.
39. Nurizzo D., Shewry S.C., Perlin M.H., et al. // *J. Mol. Biol.* 2003. V. 327. P. 491–506.
40. Huey R., Morris G.M., Olson A.J., Goodsell D.S. // *J. Comput. Chem.* 2007. V. 28. P. 1145–1152.
41. Halgren T.A. // *J. Am. Chem. Soc.* 1990. V. 112. P. 4710–4723.
42. Sanner M.F. // *J. Mol. Graphics Mod.* 1999. V. 17. P. 57–61.
43. Umeyama T., Horinouchi S. // *Bacteriol.* 2001. V. 183. P. 5506–5512.
44. Petrickova K., Tichy P., Petricek M. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000. V. 279(3). P. 942–948.
45. Scherr N., Müller P., Perisa D., et al. // *J. Bacteriol.* 2009. V. 191(14). P. 4546–4554.
46. Villarino A., Duran R., Wehenkel A. // *J. Mol. Biol.* 2005. V. 350. P. 953–963.
47. Taylor S.S., Yang J., Wu J., et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2004. V. 1697(1–2). P. 259–269.
48. Scheeff E.D., Bourne P.E. // *PloS Comput. Biol.* 2005. V. 1. P. 0359–0381.
49. Nurizzo D., Shewry S.C., Perlin M.H., et al. // *J. Mol. Biol.* 2003. V. 327. P. 491–506.
50. Durán R., Villarino A., Bellinzoni M. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005. V. 333(3). P. 858–867.
51. Alekseeva M., Elizarov S. // *Congress EurasiaBio-2010*, 13–15 apr. 2010, Moscow.
52. Brehmer D., Godl K., Zech B., et al. // *Mol. Cell Proteomics.* 2004. V. 3(5). P. 490–500.
53. Konings E.J.M., Roomans H.H.S. // *Food Chem.* 1997. V. 59. P. 599–603.
54. Попов А.Ю. Валидация – что, где, когда? // *Чистые помещения и технологические среды*, 2003. № 3.
55. Scherr N., Honnappa S., Kunz G., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. P. 12151–12156.
56. Zakharevich N.V., Osolodkin D.I., Artamonova I.I., et al. // *Congress EurasiaBio-2010*, 13–15 apr. 2010, Moscow.

УДК 575.22

Характеристика генома русского мужчины на основе анализа однонуклеотидных полиморфизмов и реконструкции последовательностей ДНК

Н. Н. Чеканов², Е. С. Булыгина¹, А. В. Белецкий², Е. Б. Прохорчук^{1,2##}, К. Г. Скрябин^{1,2#}¹ Российский научный центр «Курчатовский институт», 123182, Москва, пл. Курчатова, д. 1² Центр «Биоинженерия» РАН, 117312, Москва, просп. 60-летия Октября, д. 7, корп. 1

Авторы, внесшие одинаковый вклад в работу (расположены в алфавитном порядке).

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

Поступила в редакцию 03.09.2010 г.

РЕФЕРАТ Ранее нами было проведено ресеквенирование генома клеток крови больного раком почки (результаты депонированы в базу данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI) под номером SRA012240). В представленной работе мы определили координаты однонуклеотидных полиморфизмов (ОП) этого генома и сравнили их с координатами полиморфных участков в некоторых опубликованных геномах других людей. Нами выявлено всего 2 921 724 ОП, причем 1 472 679 из них описаны впервые. Анализ ОП позволил определить 63 462 ОП Y-хромосомы и на основании 18 маркеров отнести ее к гаплогруппе R1a1a, доминирующей у русских мужчин. Митохондриальная гаплогруппа определена как весьма распространенная в Европейской части России гаплогруппа U5a. С целью поиска специфичных для исследуемого генома протяженных нуклеотидных последовательностей ДНК проведена реконструкция генетических текстов (более 100 нуклеотидов) *de novo* на основе коротких чтений, полученных ранее с использованием двух технологических платформ секвенирования – Illumina Genome Analyzer II (далее GAI) и Applied Biosystems SOLiD (далее SOLiD). Это позволило выявить специфичные для данного генома последовательности общей длиной 154 т.п.н. (для GAI) и 4.7 т.п.н. (для SOLiD).

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА геном человека, технологии секвенирования, однонуклеотидные полиморфизмы, биоинформатика.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ОП – однонуклеотидный полиморфизм, РКП – реконструированная консенсусная последовательность.

ВВЕДЕНИЕ

Широкое распространение секвенаторов последнего поколения сделало доступным секвенирование геномов отдельных людей. В августе 2010 г. проект «1000 genomes» [1] обнародовал на своем сайте <http://www.1000genomes.org/> предварительные данные о ресеквенировании геномов 2500 человек из разных этнических групп. Ожидается, что статья с результатами этого исследования будет опубликована в ближайшее время. Основной целью проводимых исследований является поиск генетических вариаций с частотой встречаемости более 1% в популяциях человека. Помимо решения фундамен-

тальных задач популяционной генетики, подобные исследования имеют очевидную медицинскую направленность. К примеру, в конце 2009 г. был создан международный консорциум по секвенированию геномов раковых клеток ICGC (International Cancer Genome Consortium) [2]. Россия в нем представлена РНЦ «Курчатовский институт», Центром «Биоинженерия» РАН и РОЦ РАМН им. Н.Н. Блохина, которые участвуют в изучении геномов клеток рака почки. Первое успешное ресеквенирование генома человека в России было осуществлено в конце 2009 г. [3]. Получены наборы коротких последовательностей ДНК (далее чтений) генома пациента N – русского

мужчины, больного раком почки, с использованием двух технологических платформ секвенирования – SOLiD и GAI. Тем самым впервые ресеквенирован геном представителя славянских народов, не представленных в популяционной выборке проекта «1000 genomes». С другой стороны, сделан первый шаг в рамках проекта по секвенированию генома клеток рака почки. В данной работе проведена биоинформатическая обработка результатов ресеквенирования генома пациента N с целью определения ОП. Осуществлена также реконструкция протяженных участков ДНК, специфичных для пациента N.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Проявление ОП

Короткие последовательности ДНК, прочитанные на секвенаторе GAI, картировали с использованием программы SOAPaligner/soap2 версии 2.20 [4] с параметрами по умолчанию, за исключением указания размера вставки между парными чтениями. Допустимый размер вставки был установлен в пределах от 100 до 700 нуклеотидов в соответствии с результатами, полученными ранее [3]. В дальнейшем проведено определение ОП с использованием программы SOAPsnr версии 1.02 [5] с параметрами по умолчанию. Короткие последовательности ДНК, прочитанные на секвенаторе SOLiD, картировали с использованием программы Bowtie версии 0.12.5 [6] в цветовом пространстве с допущением двух ошибок на чтение и учетом качества чтения. Допустимый размер вставки был установлен в пределах от 600 до 1400 нуклеотидов также в соответствии с предыдущими данными [3]. Проявление ОП проведено с помощью программного пакета SAM tools версии 0.1.7 [7] с использованием только уникально картированных чтений.

Определение митохондриальных и Y-хромосомных гаплогрупп

Для определения митохондриальной гаплогруппы использовали чтения, полученные на секвенаторе SOLiD и обработанные с помощью программного пакета Corona Lite [3]. Список ОП генома митохондрии с координатами и значениями аллелей взят с сайта <http://www.phyloree.org/> (по состоянию на август 2010 г.). В процессе восхождения по филогенетическому дереву митохондриальных гаплогрупп, взятому с вышеупомянутого сайта, определяли аллель каждого отдельного ОП, а именно: 1) находили аллель по указанным координатам в РКП генома митохондрии, 2) подтверждали правильность этих координат, сравнивая фланкирующие последовательности (не менее 10 п.н. с каждого конца).

Для определения гаплогруппы Y-хромосомы использовали чтения, полученные на платформах GAI и SOLiD и обработанные с помощью программных пакетов Illumina Genome Analyzer Pipeline и Corona Lite соответственно [3]. Список ОП Y-хромосомы взят с сайта <http://isogg.org/> (по состоянию на август 2010 г.), за исключением тех маркеров, что не были включены в базу dbSNP. В процессе восхождения по филогенетическому дереву Y-хромосомных гаплогрупп, также взятому с вышеупомянутого сайта, определяли аллель каждого отдельного ОП следующим образом: 1) в картированных нуклеотидных последовательностях из данных GAI идентифицировали аллель по указанным в dbSNP координатам референсного генома hg18 и подтверждали правильность этих координат по фланкирующим последовательностям (не менее 10 п.н. с каждого конца или не менее 20 п.н. с одного конца); 2) в случае данных SOLiD идентифицировали аллель в РКП Y-хромосомы по фланкирующим последовательностям данного ОП из dbSNP длиной не менее 100 п.н., при наличии не более 50% пропусков в покрытии РКП чтениями. Предковый статус аллелей определяли по описанию ОП в dbSNP.

Реконструкция генетических текстов *de novo*

Сначала выбирали те чтения обеих платформ, которые не были картированы в геноме человека (hg18, за исключением нелокализованных участков). Число таких последовательностей составило 291.57 и 628.86 млн для секвенаторов GAI и SOLiD соответственно. Их использовали в качестве исходных данных для программы-сборщика коротких чтений ABySS версии 1.1.0 [8], которая использует распределенный граф de Bruijn для поиска перекрывающихся между k-мерами (последовательностями длиной k). Было проведено несколько запусков ABySS для оптимизации длины k-мера. Оптимальная длина k-мера, при котором получены контиги максимальной суммарной длины (≥ 200 п.н.), для данных GAI равна 23, а для данных SOLiD – 16.

Затем полученные *de novo* последовательности картировали на референсные геномы человека GRCh37 (hg19), Celera и HuRef с помощью программы NCBI BLAST версии 2.2.23 [9] с использованием алгоритма поиска megablast и включенной фильтрацией повторов (простых и характерных для генома человека). Последовательности, обнаруженные не во всех трех референсных геномах одновременно, повторно картировали на те же референсные геномы человека, а также на геномы приматов с использованием алгоритма поиска discontinuous megablast.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение ОП в геноме пациента N

Результаты ресеквенирования генома пациента N, полученные с использованием секвенаторов SOLiD и GAII, представлены в виде набора коротких чтений, которые доступны на сайте Национального центра биотехнологической информации (NCBI) под номером SRA012240. Статистическая обработка данных проведена ранее [3]. Дальнейшей задачей в рамках данной работы стало выявление координат ОП на основе сопоставления всех картированных в этом участке генома чтений. Эта процедура в англоязычной литературе обозначается как «SNP calling». Мы будем использовать в настоящей работе термин «проявление ОП» как наиболее правильный перевод, отражающий суть процесса. Проявление ОП проводили отдельно для данных каждой из использованных технологических платформ GAII и SOLiD. В результате были определены значения аллелей – 1 824 006 и 410 383 ОП соответственно. После перевода данных SOLiD из цветового формата чтений в FASTQ их объединили

с данными GAII и повторили процедуру проявления ОП. Суммарное количество ОП (2 921 724) превышает сумму количеств ОП, полученных при анализе данных двух технологических платформ по отдельности. Это указывает на взаимодополнение двух наборов данных по глубине перекрывания геномных районов. Сравнение координат и значений аллелей ОП проведено для следующих геномов: Крэйга Вентера [10], Джеймса Уотсона [11], Хуанминг Янга [12], а также геномов корейца [13], африканца [14] и европейца (CEU Trio Father NA12891 из проекта «1000 genomes»). Данные представлены в *табл. 1*. Исчерпывающий список координат и значений аллелей ОП приведен на сайте проекта <http://www.russiangenome.ru/>. На *рисунке* суммировано число общих и уникальных ОП, выявленных в геноме пациента N и геномах других индивидуумов. Не обнаружено корреляции между сходством одного или двух одинаковых аллелей ОП (см. *табл. 1*, строки «один одинаковый аллель», «оба аллеля одинаковые») и географическим расстоянием между условным местом происхождения соответствующего индивидуума и Москвой, которая была принята за условное место обитания русских (Вентер и Уотсон представлены как выходцы из Западной Европы). Однако анализ полученных данных методом главных компонент расположил индивидуумов в соответствии с географическими расстояниями между районами их происхождения (данные не приведены). Степень корреляции составила 0.89, при значении p-value, равном 10^{-5} .

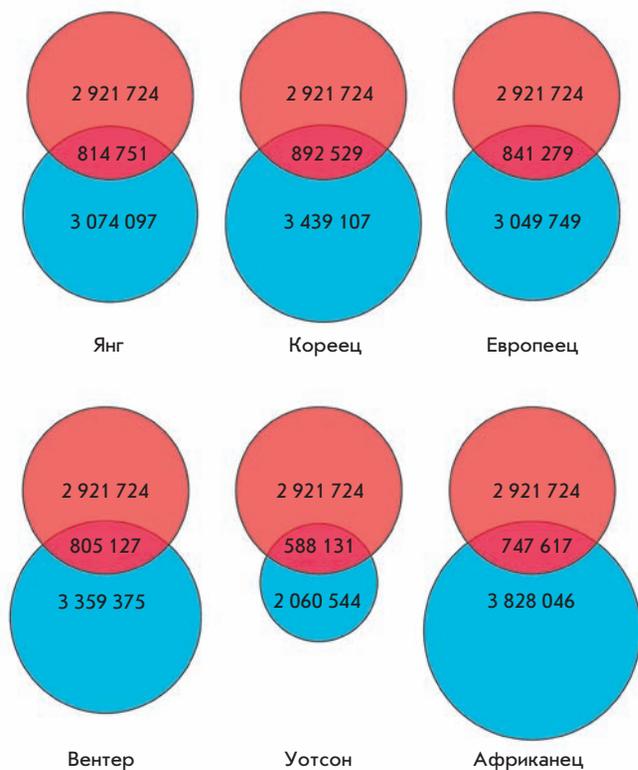


Рисунок. Уникальные и общие ОП различных персональных геномов (голубые круги) и генома пациента N (красные круги).

Определение митохондриальной и Y-хромосомной гаплогруппы пациента N

Установленные координаты и значения аллелей ОП позволили определить митохондриальную и Y-хромосомную гаплогруппы генома пациента N. Сначала были отобраны все чтения, полученные с использованием технологической платформы SOLiD и картированные на последовательности референсной митохондриальной ДНК (revised Cambridge Reference Sequence (rCRS), номер в GenBank: NC_012920) [15]. На их основе построена РКП, которая размещена на сайте <http://www.russiangenome.ru/>. Средняя плотность покрытия митохондриального генома составила 291. Из сравнения полученной последовательности с референсной следует, что митохондриальный геном пациента N принадлежит к гаплогруппе U5a (*табл. 2*), одной из наиболее распространенных в Европейской части России.

Y-хромосомная гаплогруппа определена как R1a1a на основании четырех маркеров, выявленных при анализе данных обеих технологических платформ, и 19 маркеров, совпадающих с данными, полученными хотя бы от одной технологиче-

Таблица 1. Сравнение количества ОП, найденных в персональных геномах различных людей и в геноме пациента N

	Вентер	Уотсон	Янг	Кореец	Европеец	Африканец
Всего ОП в геноме	3359375	2060544	3074097	3439107	3049749	3828046
ОП в геноме русского, GAI	1824006					
Общих ОП	510444	365955	518294	570937	532194	479420
Один одинаковый аллель	427096	285913	425024	457469	431977	384934
Оба аллеля одинаковые	81957	79797	92752	113042	99967	89402
ОП в геноме русского, SOLiD	410383					
Общих ОП	179948	141703	187675	204235	192773	178744
Один одинаковый аллель	116376	73735	119837	130518	125589	111031
Оба аллеля одинаковые	27202	57292	30423	34023	33756	32133
ОП в геноме русского, SOLiD+GAI	2921724					
Общих ОП	805127	588131	814751	892529	841279	747617
Один одинаковый аллель	508066	411521	486809	513621	481542	424153
Оба аллеля одинаковые	276881	171052	307802	357562	341765	301925

Примечание. Представлены данные, полученные с использованием двух технологических платформ по отдельности и при их комбинировании.

Таблица 2. Значения аллелей известных полиморфизмов митохондриальной ДНК пациента N, которые характеризуют его принадлежность к гаплогруппе U5a

Гаплогруппа	Координата	Референсный аллель (H2)	Диагностический аллель	SOLiD-аллель
L3	3594	C	C	C
N	10398	A	A	A
N	10400	C	C	C
N	10873	T	T	T
R	12705	C	C	C
UK	12308	A	G	G
U	11467	A	G	G
U5	9477	A	A	A
U5	16270	C	T	T
U5-sub	16399	A	G	G
U5a	14793	A	G	G
U5a	16256	C	T	T

ской платформы (табл. 3). Совпадение аллеля ОП rs2534636 пациента N с предковым аллелем подтверждает гаплогруппу R1a1, поскольку этот полиморфизм считается следствием обратной мутации. В силу того, что Y-хромосома является нерекombинирующей, следует ожидать высокую степень неравновесного сцепления ее генетических маркеров. Таким образом, все 63 462 ОП, определенные в данной работе и отнесенные к Y-хромосоме, потенциально представляют гаплотип, характерный для большинства мужчин Европейской части России, ввиду того, что гаплогруппа R1a1a доминирует

на этой территории. Список всех ОП Y-хромосомы также доступен на сайте проекта.

Реконструкция *de novo* генетических текстов, специфичных для генома пациента N

Возможность получения полной нуклеотидной последовательности персонального генома позволяет найти участки, специфичные для данного человека. Хотя такие данные еще не опубликованы в рамках проекта «1000 genomes», но исследования, проведенные группой Пекинского геномного института под руководством проф. Хуанминг Янга (Huanming Yang),

Таблица 3. Значения аллелей ОП Y-хромосомы пациента N, которые характеризуют его принадлежность к гаплогруппе R1a1a

Гаплогруппа	ОП	GA-аллель	SOLiD-аллель	Предковый аллель
R	rs2032658	Н/Д	G	A
R	rs17307398	T	T	C
R	rs4481791	C	Н/Д	G
R	rs9786261	Н/Д	A	G
R	rs891407	G	G	C
R1	rs17307070	Н/Д	T	G
R1	rs9786232	G	G	T
R1	rs9785959	G	Н/Д	C
R1	rs9786197	Н/Д	C	T
R1	rs7067478	A	Н/Д	G
R1a	rs17222573	Н/Д	G	A
R1a	rs17307677	Н/Д	C	T
R1a	rs17306692	A	Н/Д	C
R1a1	rs17222202	Н/Д	A	T
R1a1	rs17316227	Н/Д	G	A
R1a1	rs2534636	Н/Д	T	T*
R1a1a	rs17222146	Н/Д	T	C
R1a1a	rs17315926	T	T	C
R1a1a	rs17221601	Н/Д	A	T

Примечание. Жирным шрифтом выделены маркеры, выявленные при использовании обеих технологических платформ. *rs2534636 – обратная мутация для гаплогруппы R1a1.

Таблица 4. Результаты статистической обработки реконструированных *de novo* контигов, однозначно отнесенных к одному из трех референсных геномов человека

	Не найдено		Не определена хромосома		Не определена координата на хромосоме		Найдено	
	GA	SOLiD	GA	SOLiD	GA	SOLiD	GA	SOLiD
hg19	292	3	31	6	0	15	154	1
Celera	147	10	47	4	0	3	307	0
HuRef	125	9	69	8	0	0	300	0

показали, что его собственный геном содержит около 7200 уникальных контигов общей длиной приблизительно 5 млн п.н. [16]. Нами проведена реконструкция уникальных генетических текстов *de novo* из генома пациента N. Все собранные контиги длиной более 100 нуклеотидов были разделены на две категории: те, которые после использования в программе BLAST давали однозначный результат поиска (табл. 4), и те, которые не могли быть однозначно интерпретированы и требовали дополнительного анализа (общая статистика приведена в табл. 5). Нуклеотидные последовательности, полученные на секвенаторе SOLiD, не дали существенного результата ни по количе-

ству собранных контигов, ни по их суммарной длине, что, по всей видимости, обусловлено непригодностью последовательностей длиной всего 25 нуклеотидов для реконструкции сложных генетических текстов. Среди собранных контигов из последовательностей, определенных на секвенаторе GAII, наиболее интересны области, которые не имеют гомологий с референсными геномами человека, а также те, которые очень похожи на геномы приматов, но все же имеют небольшие отличия. И если последовательности из первой группы могут быть отнесены к потенциальным ошибкам сборки *de novo* программы ABySS, то последовательности второй группы, очевидно,

Таблица 5. Результаты статистического анализа реконструированных *de novo* контигов, специфичных для генома пациента N

	GA	SOLiD
Однозначно найденные в hg19	146 (44.7)	1 (0.3)
Найденные менее чем в трех референсных геномах человека одновременно	93 (27.4)	3 (0.7)
Не найденные ни в одном геноме человека	72 (21.3)	0 (0)
Найденные в геномах приматов	51 (15.4)	2 (0.5)
Из них с гомологией выше 95%	22 (6)	1 (0.2)
Всего контигов	495 (154)	17 (4.7)

Примечание. В скобках приведены длины контигов в т.п.н.

не могут быть ошибкой сборки и являются характерными для пациента N. Поиск открытых рамок считывания в данных контигах не выявил протяженных (более 30 аминокислот) кодирующих последовательностей. Последовательности всех собранных *de novo* контигов доступны на сайте проекта. Разница в количестве и длине собранных контигов между геномом пациента N и геномом Янга можно объяснить разной плотностью перекрытия геномов при ресеквенировании – 7 и 30 соответственно.

Таким образом, мы приводим характеристику генома пациента N, проведенную в сравнении с опубликованными геномами других людей. Значимость найденных полиморфных и уникальных отличий в 1) формировании генетического разнообразия этносов

и в 2) определении предрасположенности пациента N к различным болезням можно будет оценить только после накопления достаточного количества данных о персональных геномах представителей различных этнических групп и проведения ассоциативных исследований с использованием не только высокоплотных микроматриц ДНК, но и полногеномного секвенирования. ●

Работа поддержана Федеральной целевой программой «Развитие инфраструктуры наноиндустрии в Российской Федерации на 2008–2012 годы». Авторы выражают благодарность М.В. Ковальчуку за всестороннюю помощь и пристальное внимание к работе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Siva N. // Nat. Biotechnol. 2008. V. 26(3). P. 256.
- Hudson T.J., Anderson W., Artz A., et al. // Nature. 2010. V. 464(7291). P. 993–998.
- Скрябин К.Г., Прохорчук Е.Б., Мазур А.М. и др. // Acta Naturae. 2009. Т. 1. № 3. С. 113–119.
- Li R., Yu C., Li Y., et al. // Bioinformatics. 2009. V. 25(15). P. 1966–1967.
- Li R., Li Y., Fang X., et al. // Genome Res. 2009. V. 19(6). P. 1124–1132.
- Langmead B., Trapnell C., Pop M., Salzberg S.L. // Genome Biol. 2009. V. 10(3). P. R25.
- Li H., Handsaker B., Wysoker A., et al. // Bioinformatics. 2009. V. 25(16). P. 2078–2079.
- Simpson J.T., Wong K., Jackman S.D., et al. // Genome Res. 2009. V. 19(6). P. 1117–1123.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., et al. // J. Mol. Biol. 1990. V. 215(3). P. 403–410.
- Levy S., Sutton G., Ng P.C., et al. // PLoS Biol. 2007. V. 5(10). P. e254.
- Wheeler D.A., Srinivasan M., Egholm M., et al. // Nature. 2008. V. 452(7189). P. 872–876.
- Wang J., Wang W., Li R., et al. // Nature. 2008. V. 456(7218). P. 60–65.
- Kim J.I., Ju Y.S., Park H., et al. // Nature. 2009. V. 460(7258). P. 1011–1015.
- Bentley D.R., Balasubramanian S., Swerdlow H.P., et al. // Nature. 2008. V. 456(7218). P. 53–59.
- Andrews R.M., Kubacka I., Chinnery P.F., et al. // Nat. Genet. 1999. V. 23(2). P. 147.
- Li R., Li Y., Zheng H., et al. // Nat. Biotechnol. 2010. V. 28(1). P. 57–63.

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 μM ; нм, но не nm).
- Знак «–» (тире) отбивается пробелами, знаки «минус», «интервал» или «химическая связь» пробелами не отбиваются.
- В качестве знака умножения используется только «×». Знак «×» ставится только в том случае, если справа от него стоит число. Символом «·» обозначаются комплекс-

- ные соединения в химических формулах, а также нековалентные комплексы (ДНК:РНК и т.п.).
- Используются только «кавычки», но не “кавычки”.
 - В формулах используются буквы латинского и греческого алфавитов.
 - Латинские названия родов и видов животного мира пишутся курсивом, таксонов более высокого ранга, а также названия вирусов и бактериофагов в латинской транскрипции – прямым шрифтом.
 - Названия генов (кроме обозначения генов дрожжей) пишутся строчным курсивом, названия белков – прямым шрифтом.
 - Названия нуклеотидов (А, Т, G, С, U), аминокислотных остатков (Arg, Pe, Val и т.д.) и фосфатов (АТР, АМР и т.д.) пишутся в латинской транскрипции прямым шрифтом.
 - Нумерация азотистых оснований и аминокислотных остатков пишется без дефиса (Т34, Ala89).
 - При выборе единиц измерения необходимо придерживаться международной системы единиц СИ.
 - Молекулярная масса выражается в дальтонах (Да, кДа, МДа).
 - Количество пар нуклеотидов обозначается сокращениями (п.н., т.п.н.).
 - Количество аминокислотных остатков обозначается сокращением (а.о.).
 - Биохимические термины (в частности, названия ферментов) приводятся в соответствии с международными правилами IUPAC.
 - Сокращения терминов и названий в тексте должны быть сведены к минимуму.
 - Повторение одних и тех же данных в тексте, таблицах и графиках недопустимо.

ТРЕБОВАНИЯ К ИЛЛЮСТРАЦИЯМ

- Рисунки к статьям приводятся отдельными файлами в формате TIFF, при необходимости – в заархивированном виде.
- Иллюстрации должны иметь разрешение не ниже 300 dpi для цветных и полутоновых изображений и не менее 600 dpi для черно-белых иллюстраций.
- Недопустимо использование дополнительных слоев.

РЕЦЕНЗИРОВАНИЕ, ПОДГОТОВКА РУКОПИСИ К ПЕЧАТИ, ОЧЕРЕДНОСТЬ ПУБЛИКАЦИИ

Статьи публикуются по мере поступления. Очередность публикации устанавливается по дате принятия статьи к печати. Члены редколлегии имеют право рекомендовать к ускоренной публикации статьи, отнесенные редколлегией к приоритетным и получившие высокую оценку рецензентов.

Статьи, поступившие в редакцию, проходят экспертизу членов редколлегии и направляются на внешнее рецензирование. Выбор рецензента является прерогативой редакции. Рукопись направляется на отзыв специалистам в данной области исследований, и по результатам рецензирования редколлегия определяет дальнейшую судьбу рукописи: принятие к публикации в представленном виде, необходимость доработки или отклонение.

Рукопись, направленная авторам на доработку по замечаниям рецензентов и редакторов, рецензируется повторно, после чего редколлегия вновь решает вопрос о приемлемости ее для публикации. В начале публикуемой статьи

приводятся даты поступления рукописи в редакцию и принятия рукописи в печать после положительного решения рецензента.

Возвращение рукописи авторам на доработку не означает, что статья принята к печати. После получения доработанного текста рукопись вновь рассматривается редколлегией. Доработанный текст автор должен вернуть вместе с первоначальным вариантом статьи, а также ответами на все замечания.

Переработанная рукопись должна быть возвращена в редакцию в течение одной недели после получения авторами отзывов.

На всех стадиях работы с авторами, редакторами и рецензентами редакция использует электронно-почтовую связь, поэтому авторы должны быть очень внимательны к указанному в рукописи электронному адресу и должны своевременно сообщать о произошедших изменениях.

Корректуры статей редакция рассылает авторам по электронной почте в виде PDF-файла. На стадии корректуры не допускаются замены текста, рисунков или таблиц. Если это все же необходимо, то данный вопрос решается с редколлегией.

ОФОРМЛЕНИЕ ССЫЛОК

Ссылки на цитируемую литературу приводятся в тексте в порядке их цитирования, нумеруются и приводятся в квадратных скобках. Ссылке на работу в таблице или в подписи к рисунку присваивается порядковый номер, соответствующий расположению данного материала в тексте статьи.

Для книг: фамилия и инициалы автора, полное название книги, место издания, издательство, год издания, том или выпуск и общее количество страниц.

Кулаев И.С., Вагабов В.М., Кулаковская Т.В. Высокомолекулярные неорганические полифосфаты: биохимия, клеточная биология, биотехнология. М.: Научный мир, 2005. 216 с.

Ссылки на книги, переведенные на русский язык, должны сопровождаться ссылками на оригинальные издания с указанием выходных данных.

Для периодических изданий: фамилия и инициалы автора, название журнала, год издания, том, номер, первая и последняя страницы статьи. Указываются фамилии всех авторов, например:

Patutina O.A., Mironova N.L., Ryabchikova E.I., Popova N.A., Nikolin V.P., Kaledin V.I., Vlassov V.V., Zenkova M.A. // Acta Naturae. 2010. V. 2. №1 (4). P. 88–93.

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.

VII Всероссийская научно-практическая конференция -
выставка с международным участием

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА 2010

www.md2010.org

Организаторы конференции:

Минздравсоцразвития РФ,
Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
ФГУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора,
Некоммерческое партнерство
«Национальное научное общество инфекционистов»

Организатор выставки и генеральный спонсор:
ООО «ИнтерЛабСервис»

24-26 ноября 2010 г.
ГК «Космос», г. Москва

**На конференции будут обсуждаться актуальные
направления молекулярной диагностики:**

- Молекулярные технологии в диагностике инфекционных болезней;
- Современные возможности медицинской генетики;
- Фармакогенетика – от теории к практике;
- Молекулярная онкология;
- Биобезопасность;
- Инфекционные болезни животных и птиц;
- Безопасность продуктов питания и кормов для животных;
- Молекулярно-диагностические технологии в судебной медицине и криминалистике;
- Новые направления молекулярной биологии и геномной инженерии в диагностике;
- Алгоритмы использования современных лабораторных методов в клинической практике;
- Вопросы стандартизации лабораторных исследований

Дополнительная информация о регистрационном взносе, публикации трудов, условиях участия в выставке -
на официальном сайте мероприятия www.md2010.org