

# Письмо редакторов

В августе 2009 года в Шанхае проходил очередной Всемирный конгресс Международного Союза биохимии и молекулярной биологии (IUBMB). Этот форум проходит регулярно раз в три года и собирает несколько тысяч ученых со всего мира. Спектр рассматриваемых проблем на конгрессе огромен и покрывает практически все возможные тематики, которые можно объединить под общим названием «науки о живом» («Life science»). В последние годы необходимо признать, что всемирные и европейские международные конгрессы стали привлекать меньше внимания. Во многом это связано с неучастием в них «звезд первой величины», исследователей, инициировавших развитие принципиально новых направлений в науке. Ученые с большим интересом посещают более специализированные форумы, а возможности Интернета и современные телекоммуникационные системы ликвидируют зачастую необходимость личного общения. В данном случае Шанхайский конгресс был приятным исключением. Достаточно отметить, что пленарные лекции были прочитаны четырьмя Нобелевскими лауреатами – Куртом Вютрихом, Ароном Чехановером, Сиднеем Алтманом и Люком Монтанье. Три из них посвятили свои сообщения обобщению работ в русле их Нобелевских открытий, а именно ЯМР белков, убиквитин-зависимому процессингу белков и миру РНК. Люк Монтанье, первооткрыватель вируса иммунодефицита человека (премия 2008 года в области физиологии и медицины) вызвал некоторое разочарование собравшихся тем, что не стал говорить об иммунодефицитах, а прочел лекцию о проводимости электромагнитных волн через ДНК.

Общий слоган конгресса «Биомолекулы за качество жизни» («*Biomolecules for the quality of life*») определил тематику как пленарных, так и симпозиальных сессий. Биомедицинские исследования составляли подавляющую часть тематики. Со всей очевидностью было продемонстрировано на ряде конкретных примеров, что открытие нового сигнального пути, фермента, рецептора лиганда низкомолекулярного биорегулятора с неизбежностью приводит к мишень-направленному поиску нового терапевтического реагента. Этой цели посвящена как непосредственная деятельность исследовательских групп, так и патентные и прикладные подразделения компаний, работающих с данными исследователями. Все направлено на то, чтобы эффективная работа мысли ученого могла реализоваться в биомедицине. Лимитирующей стадией разработки теперь являются собственно доклинические и кли-

нические испытания. Такой отлаженный механизм обеспечил внедрение десятков новых революционных препаратов, о существовании которых невозможно было мечтать несколько десятилетий назад. В этой связи поистине революционной можно считать пленарную лекцию японского исследователя Шинья Яманака (*Shinya Yamana*), посвященную индукции плюрипотентности клеток детерминированными клеточными факторами. По всей вероятности, в скором времени будут созданы условия для клеточного «перепрограммирования». В настоящее время найдена комбинация факторов, отвечающих за «переключение» стволовых клеток и последующую дифференцировку. Проблеме генетического перепрограммирования и передаче сигнала был посвящен отдельный симпозиум. Не вызывает сомнений, что прогресс в этой области приблизит человечество к решению проблемы «клеточной» и «тканевой» терапии.

Отдельный симпозиум был посвящен молекулярным основам социально значимых болезней. Революционные успехи в области дизайна лекарств с помощью подходов комбинаторной химии привели к созданию эффективных ингибиторов клеточных рецепторов с киназной активностью. Это направление заложило основу новых противораковых соединений. Эти исследования были обобщены в докладах пионеров области Акселя Ульриха (Германия) и Иосифа Иордана (Израиль). Особое место в разделе заняли проблемы нейродегенеративных заболеваний. Они рассматривались в докладах, посвященных клеточным каналам, лекарственным соединениям, влияющим на проницаемость этих каналов, рассмотрены патологии, связанные с нарушением фолдинга белков. При этом были рассмотрены модели животных, развивающих подобные патологии. Доклады Сьюзен Аккерман (*Susan Ackerman*) и Мари Чесселет (*Marie Chesselet*) были посвящены исследованию механизмов нейродегенерации и терапевтическому воздействию на эти процессы на модельных животных.

Очень интересной была секция гликобиологии. Не вызывает сомнения, что межклеточные контакты и передача сигналов во многом зависят от характеристики «углеводного окружения» клетки. Восхищение вызвали доклады по современным протеомным исследованиям. Можно говорить, что создание протеомного портрета человека – процесс достаточно реальный.

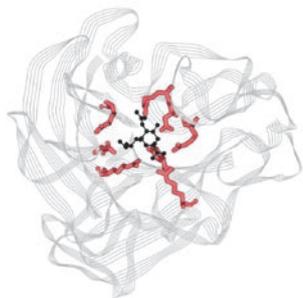
В последние годы, в связи с известными экономическими трудностями в российской науке число докладчиков на международных форумах стало минимальным. Некоторые форумы проходят вообще без участия России, что, конечно, не отражает современное состояние исследований в области наук о живом в нашей стране. Шанхайский форум был приятным исключением. В качестве симпозиальных докладчиков на него были приглашены П.Г. Георгиев, Е.С. Громова, С.М. Деев, О.А. Донцова, А.М. Егоров, С.А. Недоспасов и авторы этих строк.

Особо хочется сказать о развитии науки в Китае. Около десяти лет назад подобный форум, участие в котором приняло очень большое количество китайских ученых, был бы не возможен. Правильная политика китайского руководства по привлечению соотечественников из США и Европы дала свои плоды. Сегодня в Китае созданы современные институты и лаборатории, обеспечивающие передовой уровень исследований. ●

**А.Г. Габибов**  
**С.Н. Кочетков**

Ю.А. Штыря, Л.В. Мочалова, Н.В. Бовин

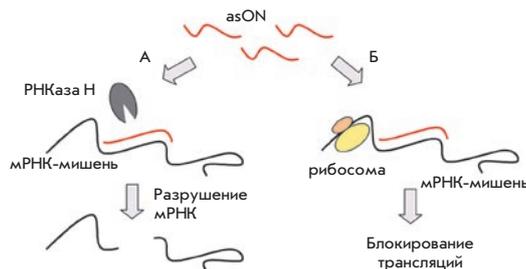
## Нейраминидаза вируса гриппа: структура и функции



Активный центр нейраминидазы вируса гриппа А (подтипа N2) в комплексе с Neu5Ac2en (2-дезокси-2,3-дидегидро-N-ацетилнейраминовой кислотой). Neu5Ac2en обозначена черным, функциональные а.о. активного центра – красным

О.А. Патутина, Н.Л. Миронова, М.А. Зенкова, В.В. Власов

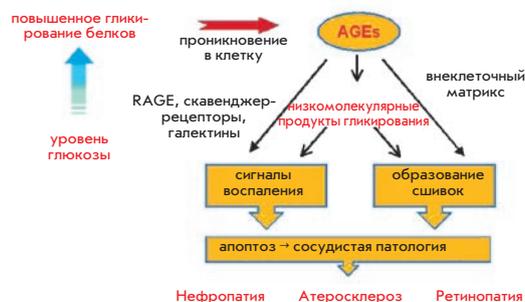
## Новые противоопухолевые препараты на основе олигонуклеотидов



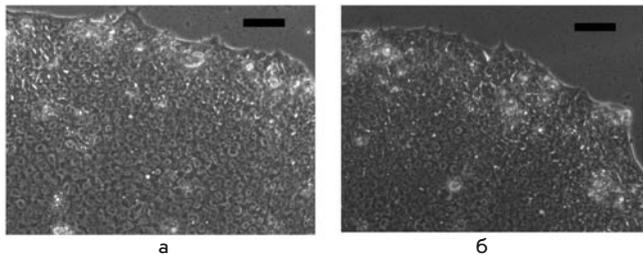
Механизмы действия антисмысловых олигонуклеотидов (asON). а – расщепление РНК в составе гетеродуплекса с asON РНКазой Н. б – блокирование трансляции за счет связывания олигонуклеотида с мРНК

Т. Щеглова, С.П. Маккер, А.Трамонтано

## Ковалентно-связывающиеся антитела подавляют глубокое гликирование: врожденный компонент системы приобретенного иммунитета



Продукты гликирования белков в результате гипергликемии или в ходе старения модифицируются и образуют продукты глубокого гликирования. Эти AGE-продукты в последствии могут распадаться на гликованные пептиды и низкомолекулярные AGE, вызывающие цитотоксичность и некроз тканей, что в итоге приводит к сосудистым патологиям, которые часто являются осложнениями при диабете



Морфология полученных из эндотелия иПК человека, растущих в бесфидерных условиях. а – фотография колонии иПК в световом поле. б – фотография колонии ЭСК человека. Масштабная линейка – 100 мкм

М.В. Шутова, А.Н. Богомазова, М.А. Лагарькова, С.Л. Киселев

## Получение и характеристика клеток человека с индуцированной плюрипотентностью

## Учредители:

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

## Редакционный совет:

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

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

## Редакционная коллегия:

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

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

*Директор по стратегическому развитию:*  
Е.Л. Пустовалова

*Руководитель проекта:* Р.Р. Петров

*Выпускающий редактор:* Е.В. Дорогова

*Научный редактор:* В.В. Сычев

*Подготовка иллюстраций и верстка:* К.К. Опарин

*Корректурa:* М.В. Чуланова

*Дизайн-проект:* Х. Шнайдер

Адрес редакции: 119991, Москва, Ленинские горы,  
Научный парк МГУ, владение 1, строение 75Г.  
Телефон/факс: +7 (495) 930 80 06.  
E-mail: knorrevd@gmail.com, rpetrov@strf.ru, vsychev@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, 2009

Номер подписан в печать 5 октября 2009 г.  
Тираж 800 экз. Цена свободная.  
Отпечатано по заказу РА «Real Profit Media»  
в типографии ООО «Принт Сэйл»

Письмо редакторов ..... 1

## ФОРУМ

В.Т. Иванов  
**Институту биоорганической химии  
имени академиков М.М. Шемякина  
и Ю.А. Овчинникова РАН – 50 лет ..... 6**

А.В. Зеленин, В.Л. Карпов  
**На передовом рубеже мировой науки. .... 9**

**Институт химической биологии и фундамен-  
тальной медицины Сибирского отделения  
РАН (Новосибирский институт биоорганиче-  
ской химии СО РАН до 2003 года) ..... 13**

## ОБЗОРЫ

В.А. Стоник  
**Морские природные соединения.  
Путь к новым лекарственным препаратам . 16**

Ю.А. Штыря, Л.В. Мочалова, Н.В. Бовин  
**Нейраминидаза вируса гриппа:  
структура и функция ..... 28**

А.В. Немухин, Б.Л. Григоренко, А.П. Савицкий  
**Компьютерное моделирование строения  
и спектров флуоресцентных белков. .... 35**

О.А. Патутина, Н.Л. Миронова, В.В. Власов,  
М.А. Зенкова  
**Новейшие подходы к лечению онкологических  
заболеваний: противоопухолевые  
препараты на основе ген-направленных  
нуклеиновых кислот ..... 47**

В.В. Терских, Е.А. Воротеляк, А.В. Васильев  
**Самоподдержание стволовых клеток . . . . . 67**

Т. Щеглова, С.П. Маккер, А.Трамонтано  
**Ковалентно-связывающиеся антитела  
 подавляют глубокое гликирование:  
 врожденный компонент системы  
 приобретенного иммунитета . . . . . 73**

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Е.Г. Салина, Х. Молленкопф, С. Кауфман,  
 А.С. Капрельянц  
**Изменение уровня экспрессии генов  
 в процессе перехода клеток *M. tuberculosis*  
 в состояние «некультивируемости» . . . . . 82**

Е.С. Княжанская, М.А. Смолов, О.В. Кондрашина,  
 М.Б. Готтих  
**Сравнительное изучение  
 каталитических характеристик  
 интеграз пенообразующего вируса  
 человека и ВИЧ-1 . . . . . 88**

Д.М. Щербакова, М.Э. Зверева, О.А. Донцова  
**Биотинилированный компонент  
 входит в состав теломеразного комплекса  
 дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* . . . . . 92**

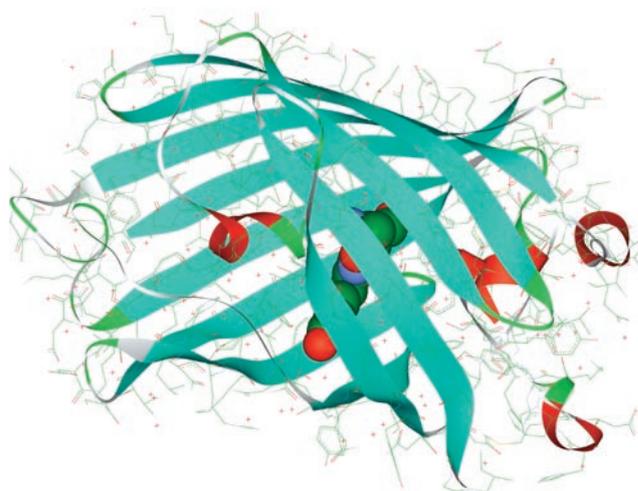
П.В. Спиринов, Д. Баскаран, П.М. Рубцов, М.А. Зенкова,  
 В.В. Власов, Е.Л. Черноловская В.С. Прасолов  
**Сравнение эффективности подавления  
 функциональной активности целевых  
 генов с помощью синтетических  
 модифицированных siРНК и shРНК,  
 экспрессируемых рекомбинантными  
 лентивирусными векторами . . . . . 98**

М.В. Шутова, А.Н. Богомазова, М.А. Лагарькова,  
 С.Л. Киселев  
**Получение и характеристика клеток  
 человека с индуцированной  
 плюрипотентностью . . . . . 104**

Е.В. Новосадова, Е.С. Мануилова, Е.Л. Арсеньева,  
 А.Н. Лебедев, Н.В. Хайдарова, В.З. Тарантул,  
 И.А. Гривенников  
**Влияние экспрессии гена *pub*  
 на дифференцировку эмбриональных  
 стволовых клеток мыши в производные  
 экто-, мезо- и энтодермы *in vitro* . . . . . 107**

Д.А. Давыдова, Е.А. Воротеляк, Ю.А. Смирнова,  
 Р.Д. Зиновьева, Ю.А. Романов, Н.В. Кабаева,  
 В.В. Терских, А.В. Васильев  
**Характеристика фенотипа клеток  
 из амниотической жидкости человека . . . . 112**

**Правила для авторов . . . . . 120**



### РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ

Структура зеленого флуоресцентного белка GFP (PDB ID: 1EMA), выделена хромофорная группа. Флуоресцентные белки имеют бочкообразную структуру, состоящую из плотно подогнанных β-листов, хорошо экранирующих от внешней среды хромофорную группу, в основе которой – молекула гидроксibenзилиден-имидазолина, формирующаяся в природных условиях из трех аминокислотных остатков внутри белковой глобулы. Превращения, происходящие с хромофорной группой внутри этой макромолекулы при освещении определенными длинами волн, лежат в основе фотофизических свойств флуоресцирующих белков.

Изображение было создано с помощью *Discovery Studio 2.5 Visualizer* (Accelrys Software Inc.)

# Институту биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН – 50 лет

Академик РАН В.Т. Иванов, директор института

Постановлением Президиума АН СССР от 20 февраля 1959 года в системе Отделения химических наук был организован Институт химии природных соединений, которому было суждено сыграть важную роль в развитии отечественной физико-химической биологии. Создание института было вызвано бурным развитием химии биологически активных, в том числе природных, соединений в мире, возрастающей важностью этого направления для понимания механизмов биологических процессов и создания новых лекарственных средств.

**В**озглавил институт академик Михаил Михайлович Шемякин, лидер отечественной химии антибиотиков, сумевший привлечь ведущих специалистов, работающих в различных направлениях науки – химии углеводов (Н.К. Кочетков, член-корреспондент АН СССР, будущий академик), химии стерои-

дов (И.В. Торгов, будущий член-корреспондент АН СССР), химии белка (В.Н. Орехович и В.М. Степанов), химии антибиотиков (будущие академики А.С. Хохлов и М.Н. Колосов, а также будущий член-корреспондент В.К. Антонов), химии липидов (будущий член-корреспондент Л.Д. Бергельсон). Пришли и недавние вы-

пускники вузов, многие из которых впоследствии также стали членами АН СССР и в значительной мере определили научное лицо института (Ю.А. Овчинников, В.Ф. Быстров, Е.В. Гришин, В.Т. Иванов, А.И. Мирошников, Е.Д. Свердлов).

Институт быстро стал ведущим в своей области научным учреждением страны, активно представляющим результаты исследований на международной арене (публикации в зарубежных журналах, участие в международных симпозиумах).

На примере депсипептидных антибиотиков был расшифрован молекулярный механизм индуцированной катионной проницаемости биологических и искусственных мембран, выявлены причины уникальности в ряде случаев ионной избирательности и осуществлен направленный синтез серии новых высокоэффективных мембранно-активных комплексов. Был открыт новый класс



неглицеридных нейтральных липидов, присутствующих в самых разных организмах (растениях, животных, микроорганизмах), и показана их роль в функционировании биомембран. Активно разрабатывались новые методы синтеза углеводов, стероидов и липидов, а также избирательной модификации нуклеиновых кислот. Впервые был осуществлен полный синтез тетрациклина – одного из самых сложных и важных в практическом применении антибиотиков. В совместной работе нескольких лабораторий был предложен новый комплексный подход к установлению пространственной структуры пептидов в растворе, основанный на согласованном применении набора спектральных и расчетных методов. Эффективность подхода была продемонстрирована на примере большого числа природных и синтетических пептидов, в том числе мембранно-активных антибиотиков и токсинов. Был предложен принципиально новый, так называемый топохимический подход к направленному созданию биологически активных пептидов – гормонов, антибиотиков, токсинов, субстратов и ингибиторов ферментов.

В 1970 году, после смерти М.М. Шемякина, институт возглавил академик

Ю.А. Овчинников, ставший в 1974 году вице-президентом АН СССР.

Семидесятые и восьмидесятые годы были периодом бурного развития отечественной физико-химической биологии и активного сокращения разрыва в уровне исследований с зарубежными коллегами. Правительство приняло решение о всесторонней поддержке этого научного направления, в существенной степени определяющего прогресс в области медицины, сельского хозяйства, охраны окружающей среды и биобезопасности. Главным учреждением, координирующим работу по выполнению соответствующих постановлений, был определен Институт химии природных соединений. Его основной задачей стало исследование биологических проблем методами органической химии (что послужило причиной смены в 1973 году названия на «Институт биоорганической химии» (ИБХ); соответственно, удельный вес биологических исследований в нем существенно вырос. Институты с аналогичными названиями и научными задачами были организованы в Новосибирске, Владивостоке, Киеве, Минске и Ташкенте. Начиная с 1975 года в издательстве «Наука» издается журнал «Биоорганическая химия», в этом же году на биологическом факультете МГУ организована

на кафедра биоорганической химии, возглавляемая Ю.А. Овчинниковым. В 1974 году на юго-западе Москвы начато строительство нового здания института, вошедшее в строй в 1984 году. Ученые получили в свое распоряжение великолепный комплекс сооружений, включающий специализированные помещения с инженерным оборудованием, которое и по сей день исправно выполняет свои функции.

В соответствии с логикой развития науки центр тяжести исследований института сместился от низкомолекулярных биорегуляторов к основным биополимерам клетки, в первую очередь белкам и нуклеиновым кислотам. В 1972 году в совместной работе двух институтов – ИБХ и Института молекулярной биологии – впервые в нашей стране была установлена полная первичная структура белка – цитоплазматической аспаратамиотрансферазы из сердечной мышцы свиньи, что в то время стало значительным достижением. В последующие годы число секвенированных белков росло лавинообразно. Особо следует отметить пионерские работы по установлению структур мембранных белков – бактериородопсина (1978 год) и родопсина быка (1982 год), выполненные в условиях жесткой конкуренции с лучшими зарубежными лабораториями и про-

демонстрировавшие высокий уровень отечественной физико-химической биологии.

Начиная с 80-х годов институт становится одним из ведущих биотехнологических центров страны. Силами его сотрудников активно развиваются методы химико-ферментативного синтеза нуклеиновых кислот, позволившие приступить к решению важной прикладной задачи – созданию технологий генно-инженерного производства белковых лекарственных препаратов. Полученный в институте штамм-продуцент интерферона  $\alpha 2$  послужил основой для последующего производства этого важного лекарственного препарата. Начиная с 1985 года, а после 1988 года уже в отсутствие безвременно ушедшего из жизни Ю.А. Овчинникова институт был головной организацией в структуре Межотраслевого научно-технологического комплекса «Био-ген», объединявшего десятки научных и производственных биотехнологических центров страны. Начиная с 1992 года ИБХ в течение ряда лет возглавлял российскую программу «Новейшие методы биоинженерии».

В 1979 году было принято решение об организации филиала ИБХ в Пущино, и в 1988 году завершено его строительство. В состав филиала входят помещения для выращивания растений в контролируемых условиях, уникальный питомник лабораторных животных и фармакологические лаборатории для проведения доклинических испытаний лекарственных препаратов. Тем самым существенно расширились возможности института для проведения работ в области биотехнологии растений и создания новых лекарственных средств.

В настоящее время Институт биорганической химии является крупнейшим в Отделении биологических наук РАН. В его состав входят более 40 независимых лабораторий и групп, ведущих исследования по широкому спектру задач. Ученым советом ИБХ РАН утверждены следующие основные направления работы:

- поиск, выделение и изучение структуры новых биомолекул. Исследование механизма действия и взаимосвязи структуры – функция;
- биокатализ;
- структура и функция белков и пептидов;

- структура и функция нуклеиновых кислот, молекулярные механизмы генетических процессов;
- механизмы узнавания биомолекул и передачи сигнала в биологических системах;
- молекулярная и клеточная иммунология;
- биомедицинские исследования;
- фундаментальные и прикладные аспекты биотехнологии;
- новые реагенты, материалы и оборудование.

По каждому из перечисленных направлений получены новые, оригинальные данные, отраженные в сотнях журнальных публикаций, патентах и отчетах. Среди наиболее заметных достижений последних лет следует упомянуть: обнаружение в морских организмах (коралловых полипах, рачках) новых семейств флуоресцентных белков, установление их структуры и создание на их основе генетически кодируемых маркеров для визуализации клеточных процессов. Из ядов животных выделены белковые компоненты, обладающие уникальной избирательностью действия на мембранные, в частности болевые, рецепторы. Обнаруженные белки могут послужить инструментом для изучения механизмов передачи сигналов в биологических системах и для создания новых лекарственных средств. В Институте биорганической химии РАН разработаны новые методологические подходы к сравнению полных геномов близкородственных организмов. Метод использован для выявления генетических отличий человека от шимпанзе, связанных с интеграцией эндогенных ретровирусов. Создано новое направление в исследовании пептидов, названное пептидомикой. Проведен тотальный скрининг ряда биологических объектов на присутствие эндогенных пептидов, и показано, что источником биологически активных пептидов могут являться любые белки, в том числе обладающие хорошо изученной собственной функцией (например, гемоглобин).

Из работ практической направленности следует отметить создание новых лекарственных препаратов («Дельгаран», «Ликопид»), зарегистрированных в Государственном реестре лекарственных средств Российской Федерации, и организацию

производства таких важнейших рекомбинантных белковых препаратов, как инсулин человека и гормон роста человека. В настоящее время около 15 % потребностей системы здравоохранения Москвы в инсулине обеспечивается нашим институтом.

Сколько-нибудь полное рассмотрение достижений Института биорганической химии РАН выходит далеко за пределы данного очерка. Однако даже приведенные здесь единичные примеры говорят о незаурядном потенциале его коллектива и его больших перспективах. Работы сотрудников института оценены двумя Ленинскими премиями, десятью Государственными премиями в области науки и техники, пятью премиями Правительства РФ в области науки и техники, премиями АН СССР и РАН имени А.Н. Баха, А.О. Ковалевского, Ю.А. Овчинникова и М.М. Шемякина.

Важным направлением деятельности института, позволившим сохранить «научный тонус» в период массового отъезда ученых на работу в зарубежные лаборатории, является его участие в подготовке кадров в области биоорганической химии и биотехнологии. В институте создан Учебно-научный центр, взаимодействующий с рядом профильных вузов Москвы, Санкт-Петербурга и Пущина. Ведущие ученые ИБХ РАН читают специализированные курсы лекций, более 100 студентов высших курсов распределены по его лабораториям для выполнения курсовых и дипломных работ, организована серия практикумов, принимаются зачеты и экзамены. В итоге институт имеет возможность ежегодно принимать в аспирантуру или постоянный штат несколько десятков выпускников, прошедших полноценную подготовку и способных решать сложные научные задачи.

В целом, Институт биорганической химии может сегодня рассматриваться как одно из ключевых звеньев в системе институтов Отделения биологических наук РАН. По своему кадровому составу и инструментальным возможностям он готов к выполнению научных задач любой степени сложности. Необходимо лишь, чтобы этот потенциал был востребован нашим обществом и поддержан на государственном уровне. ●

# На передовом рубеже мировой науки

д.б.н. А.В. Зеленин, д.б.н. В.Л. Карпов

Создание и организация Института молекулярной биологии (в течение первых шести лет он носил название Института радиационной и физико-химической биологии Академии наук СССР) неразрывно связаны с именем выдающегося биохимика и молекулярного биолога XX столетия академика Владимира Александровича Энгельгардта. Широкую известность и мировое признание как ученый Владимир Александрович получил еще в 30-е годы за открытие процесса окислительного (дыхательного) фосфорилирования с участием АТФ. В начале 40-х он вновь прославился, когда вместе со своей женой, Милицей Николаевной Любимовой, открыл ферментативную активность мышечного белка миозина, что привело Владимира Александровича к концепции совмещения структуры и функции биологических соединений на уровне индивидуальных молекул. Эти работы вошли в золотую сокровищницу науки, и Владимир Александрович по праву относится к числу основателей молекулярной биологии в нашей стране.

## К ПЯТИДЕСЯТИЛЕТИЮ ИНСТИТУТА МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ ИМ. В.А. ЭНГЕЛЬГАРДТА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

В середине 50-х годов он осуществил крутой поворот в своей научной карьере, став академиком-секретарем Отделения биологических наук Академии наук СССР. Естественно, что ему сразу пришлось включиться в работу по восстановлению и укреплению практически разрушенной в стране экспериментальной биологии и генетики. Важнейшим этапом этого процесса он считал создание первого в стране специализированного молекулярно-биологического института, что ему и удалось сделать при решительной поддержке президента АН СССР А.Н. Несмеянова и группы выдающихся физиков – И.В. Курчатова, П.Л. Капицы и И.Е. Тамма. Постановление президиума Академии наук СССР о создании нового института молекулярно-биологического профиля было принято в апреле 1957 года, но фактически этот институт начал работать двумя годами позже.

В.А. Энгельгардт сумел привлечь в Институт молекулярной биологии (ИМБ) плеяду выдающихся ученых, среди которых в первую очередь необходимо назвать биохимиков А.Е. Браунштейна и А.А. Баева, цитогенетика А.А. Прокофьеву-Бельговскую, клеточного биолога М.Н. Мейселя, биофизика М.В. Волькенштейна, физика Л.А. Тумермана, кристаллографа Н.С. Андрееву. Одновременно с ними пришло много молодых ученых, заинтересовавшихся новой наукой, и выпускников различных вузов.

Из молодого поколения лидеров необходимо назвать Г.П. Георгиева, А.Д. Мирзабекова, А.А. Краевского, Р.М. Хомутова, Л.Л. Киселева. В результате уже через короткий промежуток времени, к моменту приобретения институтом своего нынешнего названия он представлял собой сложившийся активно работающий коллектив, усилия которого сконцентрировались вокруг определенного круга тем. Среди таких тем следует отметить исследования структуры и механизмов биосинтеза нуклеиновых кислот, первичной и пространствен-

ной структур белков и их комплексов, а также механизмов их функционирования на уровне молекул в системах *in vitro*, в вирусах и клетках. Данная проблематика определила основное направление деятельности института на многие годы, правда, в ходе дальнейшего развития она подвергалась значительной модификации.

Институт начал приобретать все большую известность не только в нашей стране, но и за рубежом. В связи с этим в первую очередь следует упомянуть расшифровку первичной структуры валиновой транспортной РНК, выполненную под руководством А.А. Баева. Это была первая структура биополимера, расшифрованная в нашей стране, и шестая в мире первичная структура тРНК. Среди успехов последующих лет следует также отметить цикл разносторонних исследований по изучению передачи информации в клетках эукариот, механизмов регуляции экспрессии генов и природы мобильных генетических элементов дрозофилы, по расшифровке структуры хроматина, установление с высоким разреше-



нием третичной структуры пепсина и ряда других белков. Развитие получили разработки биохимических основ биосинтеза белков, химических основ биокатализа и физики биополимеров, а также создание новых направленных ингибиторов биологических процессов. Созданный под руководством А.А. Краевского препарат фосфазид («Никавир») стал важным лекарством, которое используется для помощи больным иммунодефицитом человека и способствует продлению их жизни. Работы коллектива А.А. Прокофьевой-Бельговской заложили основу медико-генетической службы в нашей стране.

Во второй половине 80-х – начале 90-х годов произошла значительная модификация тематической направленности деятельности института. Была создана современная приборная база для интенсификации работ по молекулярной биологии клетки, развернуты исследования в таких новых направлениях, как иммуноонкология, иммуногенетика, а усилиями А.Д. Мирзабекова были инициированы работы по развитию технологии биологических микрочипов. Эти исследования активно проводятся в институте и в настоящее время. Большую известность приобрела двухсторонняя

российско-американская лаборатория (Институт молекулярной биологии в Москве и Аргоннская национальная лаборатория в Чикаго, являющаяся одним из ведущих центров по развитию атомной энергетики и наиболее актуальных проблем фундаментальной науки США). В результате деятельности этого международного коллектива на базе разработок ИМБ была создана технология гелевых микрочипов, приобретающих все большую востребованность в молекулярной диагностике инфекционных и онкологических заболеваний.

Создавая институт, В.А. Энгельгардт положил в его основу принцип «трех китов» молекулярной биологии того времени – проведение исследований на стыке физики, химии и биологии.

Почти сразу с момента организации институт стал центром кристаллизации сил отечественных ученых, занимавшихся или интересовавшихся молекулярной биологией. Этому способствовали многочисленные школы, конференции и совещания, организованные институтом. В результате Институт молекулярной биологии занял одно из первых мест в ряду учреждений, способствовавших возрождению биологической

науки в стране. Следует подчеркнуть важную роль в развитии отечественной науки программы «Ревертаза» и советской (позднее российской) программы «Геном человека».

Основными направлениями научной деятельности института в настоящее время являются:

- структура и функция нуклеиновых кислот, белков и их комплексов;
- структурная и функциональная геномика;
- молекулярная биология клетки;
- молекулярная иммунология;
- бионанотехнологии и основы медицинской диагностики.

В институте выполнен ряд работ, внесших значительный вклад в мировую молекулярную биологию, в развитие современных представлений о физико-химических основах живых систем. Невозможно полностью в данном кратком обзоре осветить широкий спектр исследований, проводимых в ИМБ, поэтому приходится останавливаться только на некоторых, заслуживающих особого внимания.

Успешно проводятся исследования на стыке наук: молекулярной иммунологии, молекулярной генетики, биорганической химии, биотехнологии, медицины. Основные интересы и направления деятельности: физиологические функции, механизмы действия и регуляции цитокинов – белковых медиаторов иммунной системы, включающие механизмы активации цитокинов, в т.ч. всю цепочку передачи сигнала, начиная с активации рецепторов врожденного иммунитета, а также защитные и патологические свойства цитокинов семейства фактора некроза опухоли (ФНО). В частности, созданы уникальные живые системы – мышцы с выключением гена ФНО в отдельных клетках иммунной системы [1], мышцы с выключением гена лимфотоксина [2]. С использованием этих мышечей получены новые результаты, важные для физиологии и медицины [3–5]. Прикладные аспекты данных исследований связаны с характеристикой новых раковых антигенов человека и возможностью их использования для диагностики и мониторинга онкологических заболеваний, а также с получением новых терапевтических препаратов.

Сотрудниками института выявлена важная профилактическая функция

гена р53 – его способность работать в клетке в качестве антиоксиданта, снижать уровень кислородных радикалов. Это достигается за счет зависимой от р53 настройки антиоксидантных защитных систем, спасающих ДНК клетки от повреждений, которые возникают при физиологических нагрузках. В результате показано, что р53 существенно замедляет процесс приобретения мутаций, что обеспечивает профилактику злокачественных заболеваний и преждевременного старения [6, 7]. Разработан прототип нового противоопухолевого средства: малая молекула RETRA, с высокой избирательностью убивающая опухолевые клетки за счет активации белка р73 [8]. Открыта четвертая ядерная РНК полимеразы, осуществляющая транскрипцию части мРНК в клетках животных и человека [9].

Активные работы проводятся в области регуляции генной транскрипции на примере дрозофилы. В этом направлении достигнуты значительные успехи. Открыт новый белковый комплекс дрозофилы, связывающийся с ядерными порами и отвечающий за экспорт мРНК из ядра. Было показано, что транскрипционный фактор E(y)2, являющийся компонентом данного комплекса, присутствует в мультибелковом транскрипционном комплексе SAGA и обеспечивает связь между транскрипцией и экспортом мРНК активно работающих генов, т.е. был открыт новый механизм, обеспечивающий эффективную экспрессию гена [10–12]. Установлено, что активатор транскрипции TRF2, содержащий домен, гомологичный промотор-связывающему домену основного активатора транскрипции белка TBP, играет важную роль в поддержании структуры хроматина и необходим для его конденсации [13].

Продолжаются исследования в традиционно успешном для института направлении – изучении механизмов трансляции. В последние годы была разработана система, позволяющая *in vitro* анализировать вклад любого компонента трансляционного комплекса на разных этапах белкового синтеза. Показано, что гидролиз ГТФ предшествует гидролизу пептидил-тРНК при терминации трансляции, а eRF3 резко ускоряет эту реакцию [14]. В структуре факторов термини-

зации первого класса бактерий, эукариот и архей N-домен ответствен за узнавание стоп-кодона мРНК, C-домен – за связывание с eRF3, а в M-доме обнаружен универсальный GGQ мотив, необходимый для гидролиза пептидил-тРНК в рибосоме. Показано, что белок eRF3 обладает ГТФ-активностью, зависящей от eRF1 и рибосом, и образует *in vitro* комплекс с eRF1. Установлена роль гуаниловых нуклеотидов в функционировании элонгационного фактора трансляции EF-G [15, 16].

Сотрудниками ИМБ открыт новый класс мобильных генетических элементов, названный «Пенелопа-подобные элементы» [17]. Представители этого класса встречаются в сотнях видов животных от коловраток до рыб и рептилий. Показано, что элемент «Пенелопа» отвечает за синдром гибридного дисгенеза у *Drosophila virilis*. Предложена модель хромосомного видообразования, в которой ведущая роль отводится мобильным элементам, способным при определенных условиях приводить к «взрыву» изменчивости.

Широкое развитие получили работы в области биоинформатики, так, например, обнаружена связь феноменов геномного полиморфизма и альтернативного сплайсинга, обеспечивающих многообразие протеома человека [18]. Был разработан вычислительный метод для предсказания эффекта замены аминокислот в белках, создана база данных функциональных полиморфизмов белков в геноме человека (<http://www.snpr.imb.ac.ru>) [19].

Фундаментальные научные разработки сотрудников ИМБ используются в прикладных областях. Инициированная и разработанная под руководством академика А.Д. Мирзабекова технология гелевых биочипов получила дальнейшее инновационное развитие и доведена до запатентованной и внедренной в медицинскую практику высокотехнологичной продукции, которая позволяет проводить экспресс-диагностику социально значимых инфекционных, онкологических, сердечно-сосудистых и наследственных заболеваний, а также выявлять особо опасные инфекции и продуцируемые ими биотоксины [20, 21]. Организовано опытное производство, позволяющее изготавливать

несколько тысяч биочипов в день. Сконструирован и зарегистрирован в Росздравнадзоре для медицинского применения анализатор биочипов, а также ряд тест-систем на основе биочипов для различных приложений в медицинской диагностике, включая тест-систему для генотипирования 36 подтипов гепатита С (международная заявка на патент РСТ/RU2007/000438 совместно с Университетом и госпиталем г. Тулуза) [22]. Разработан метод количественного определения белков на основе совмещения технологии биочипов и время-пролетной масс-спектрометрии [23].

Тест-системы на основе биочипов позволяют идентифицировать и анализировать: чувствительность микобактерий туберкулеза к лекарственным препаратам; вирусы иммунодефицита человека (HIV-1), гепатитов В и С (36 подтипов), гриппа А (30 подтипов, включая птичий грипп H5N1 и свиной грипп H1N1), простого герпеса (2 подтипа), оспы (6 подтипов); возбудитель сибирской язвы; белковые маркеры онкозаболеваний (12 онкомаркеров) и биотоксины (9 типов); хромосомные aberrации, определяющие 13 типов лейкозов; индивидуальный фармакогенетический статус, генетическую предрасположенность к определенным онкологическим, сердечно-сосудистым и наследственным заболеваниям; генетические маркеры личности (18 маркеров, определяющих более 1000 вариантов генома человека). Биочипы для определения возбудителя туберкулеза и выявления его лекарственно-устойчивых форм позволили сократить время анализа с 6–10 недель до нескольких часов и оперативно назначать адекватную терапию. Биочип-диагностика применяется более чем в 30 противотуберкулезных центрах России и стран СНГ. Биочипы для типирования хромосомных aberrаций при онкозаболеваниях крови сертифицированы и применяются для уточнения прогноза и выбора стратегии лечения в Российской детской клинической больнице (Москва), проводящей анализ образцов, поступающих из 18 региональных гематологических центров РФ.

Создан метод проведения ПЦР в ячейках биочипа в реальном времени, что позволяет не только обнаруживать в образце патогенные бактерии,

вирусы, раковые клетки, но и оценивать одновременно их количество по всему анализируемому множеству [24]. Разрабатывается автоматизированное устройство на основе сменных модулей для выделения микроколичеств нуклеиновых кислот из биологических образцов. Последующая интеграция такого модуля и системы для проведения ПЦР на биочипе с детекцией в режиме реального времени приведет к появлению принципиально нового устройства – лаборатории-на-чипе. Конструкция такого устройства будет исключать контакт анализируемого образца с внешней средой, что существенно снижает вероятность заражения персонала и возникновения контаминации.

Совместно с Институтом спектроскопии РАН разработаны и защищены девятью патентами аналитические системы на базе портативного дихрометра, которые позволяют обнаруживать наличие различных соединений в анализируемых средах. На основе жидкокристаллических дисперсий нуклеиновых кислот разработаны наноконструкции, которые могут вы-

ступать в качестве носителей атомов тяжелых элементов для нейтрон-захватывающей терапии опухолевых заболеваний.

К прикладным работам можно отнести также исследования по геномной дактилоскопии, позволившие провести генетическую идентификацию останков императора Николая II и членов его семьи. Успешно продолжают работы по разработке антивирусных препаратов, в основе которых лежит оригинальный отечественный анти-ВИЧ-препарат «Никавир». Получен ряд новых ингибиторов репликации вируса гепатита С, создан аналог антигерпетического препарата ацикловира, подавляющий репликацию штаммов вируса герпеса, устойчивых к ацикловиру [25].

За достижения в области фундаментальной и прикладной науки сотрудники ИМБ РАН в разное время отмечены двумя Ленинскими и восемью Государственными премиями, Демидовской премией, премией Федерации европейских биохимических обществ (FEBS) и другими многочисленными наградами. Молодые ученые инсти-

тута неоднократно получали премии Ленинского комсомола, а также были удостоены Государственной премии РФ в области науки и техники.

В отзывах зарубежных ученых в связи с юбилеем института был высоко оценен вклад ИМБ РАН в развитие современной молекулярной биологии, в частности, было отмечено, что в Институте им. Энгельгардта работают талантливые исследователи и что даже в самые трудные годы сотрудники института сохраняли представление об универсальности науки, не знающей государственных границ, и сумели внести большой вклад в развитие молекулярной биологии [26].

Институт молекулярной биологии вступает в шестой десяток своего существования как первоклассное научное учреждение, имеющее все необходимое для проведения исследований в области молекулярной и клеточной биологии на мировом уровне. Научные работы поддерживаются множеством отечественных и зарубежных грантов, а многочисленная научная молодежь позволяет с надеждой и уверенностью смотреть в будущее. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Grivennikov S.I., Tumanov A.V., Liepinsh D.J., Kruglov A.A., Marakusha B.I., Shakhov A.N., Murakami T., Drutskaya M.S., Förster I., Clausen B.E., Tassarollo L., Ryffel B., Kuprash D.V., Nedospasov S.A. Distinct and non-redundant in vivo functions of TNF produced by T cells and macrophages/ neutrophils: protective and deleterious effects. *Immunity*. 2005. 22. 93–104.
- Liepinsh D.J., Grivennikov S.I., Lagarkova M.A., Drutskaya M.S., Klarmann K.D., Lockett S.J., McAuliffe M., Tassarollo L., Keller J.R., Kuprash D.V., Nedospasov S.A. Novel lymphotoxin alpha knockout mice with unperturbed TNF expression: reassessing LTalpha biological functions. *Mol Cell Biol*. 2006. 26. 4214–4225.
- Cui C.-Y., Hashimoto T., Grivennikov S.I., Piao Y., Nedospasov S.A., and Schlessinger D. Ectodysplasin activates the lymphotoxin-beta pathway for hair follicle differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006. 103. 9142–9147.
- Welniak L.A., Kuprash D.V., Tumanov A.V., Panoskaltzis-Mortari A., Blazar B.R., Sun K., Nedospasov S.A., and Murphy W.J. Peyer's patches are not required for acute lethal graft-versus-host disease after myeloablative conditioning and murine allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 2006. 107. 410–412.
- Tumanov A.V., Koroleva E.P., Christiansen P.A., Khan M.A., Ruddy M.J., Burnette B., Papa S., Franzoso G., Nedospasov S.A., Fu Y.X., Anders R.A. T cell-derived lymphotoxin regulates liver regeneration. *Gastroenterology*. 2009. 136. 694–704.
- Sablina A.A., Budanov A.V., Ilyinskaya G.V., Agapova L.S., Kravchenko J.E., Chumakov P.M. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat. Medicine*. 2005. 11. 1306–1313.
- Budanov A.V., Sablina A.A., Feinstein E., Koonin E.V., Chumakov P.M. Regeneration of peroxiredoxins by p53-regulated sestrins, homologs of bacterial AhpD. *Science*. 2004. 304. 596–600.
- Kravchenko J.E., Ilyinskaya G.V., Komarov P.G., Agapova L.S., Kochetkov D.V., Strom E., Frolova E.I., Kovriga I., Gudkov A.V., Feinstein E., Chumakov P.M. Small molecule RETRA suppresses mutant p53-bearing cancer cells through a p73 dependent salvage pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. 105. 6302–6307.
- Kravchenko J.E., Rogozin I.B., Koonin E.V., Chumakov P.M. Transcription of mammalian mRNAs by a novel nuclear RNA polymerase of mitochondrial origin. *Nature*. 2005. 436. 735–739.
- Shidlovskii Y.V., Krasnov A.N., Nikolenko J.V., Lebedeva L.A., Kopantseva M., Ermolaeva M.A., Ilyin Yu.V., Nabirochkina E.N., Georgiev P.G. and Georgieva S.G. A novel multidomain transcription coactivator SAYP can also repress transcription in heterochromatin. *EMBO Journal*. 2005. 24. 97107.
- Kurshakova M., Krasnov A., Kopytova D., Shidlovskiy Y., Nikolenko J., Nabirochkina E., Splender D., Schultz P., Tora L., Georgieva S. SAGA and a novel Drosophila export complex anchor efficient transcription and mRNA export to NPC. *EMBO J*. 2007. 26. 4956–4965.
- Krasnov A., Kurshakova M., Ramensky V., Mardanov P., Nabirochkina E., Georgieva S. A retrocopy of a gene can functionally displace the source gene in evolution. *Nucleic Acids Res*. 2005. 33. 6654–6661.
- Kopytova D., Krasnov A., Kopantseva M., Nabirochkina E., Nikolenko J., Kurshakova M., Lebedeva L., Korochkin L., Tora L., Georgiev P., Georgieva S. The two isoforms of Drosophila TRF2 are essential for embryonic development, premeiotic chromatin condensation and proper differentiation of germ cells of both sexes. *Mol. Cell. Biol*. 2006. 26. 7492–7505.
- Alkalaeva E.Z., Pisarev A.V., Frolova L.Yu., Kisselev L.L., Pestova T.V. In vitro reconstitution of eukaryotic translation reveals cooperativity between release factors eRF1 and eRF3. *Cell*. 2006. 125. 1125–1136.
- Mitkevich V., Kononenko A.V., Petrushanko I.Yu., Yanvarev D.V., Makarov A.A., Kisselev L.L. Termination of translation in eukaryotes is mediated by the quaternary eRF1·eRF3·GTP·Mg<sup>2+</sup> complex. The biological roles of eRF3 and prokaryotic RF3 are profoundly distinct. *Nucleic Acids Res*. 2006. 34. 3947–3954.
- Haurlyuk V., Mitkevich V.A., Eliseeva N.A., Petrushanko I.Yu., Ehrenberg M., Makarov A.A. The pretranslocation ribosome is targeted by GTP-bound EF-G in partially activated form. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. 105. 15678–15683.
- Pyatkov K.I., Arkhipova I.R., Malkova N.V., Finnegan D.J., Evgen'ev M.B. Reverse transcriptase and endonuclease activities encoded by Penelope-like retroelements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. 101. 14719–14724.
- Ramensky V.E., Nurtudinov R.N., Neverov A.D., Mironov A.A., Gelfand M.S. Positive selection in alternatively spliced exons of human genes. *Am J Hum Genet*. 2008. 83. 94–98.
- Sunyaev S., Kondrashov F.A., Bork P., Ramensky V. Impact of selection, mutation rate and genetic drift on human genetic variation. *Hum Mol Genet*. 2003. 12. 3325–3330.
- Mikhailovich V., Gryadunov D., Kolchinsky A., Makarov A.A. and Zasedatelev A. DNA microarrays in the clinic: infectious diseases. *Bioessays*. 2003. 30. 673–682.
- Rubina A.Yu., Kolchinsky A., Makarov A.A., Zasedatelev A.S. Why 3D? Gel-Based Microarrays in Proteomics. *Proteomics*. 2008. 8. 817–831.
- Gryadunov D.A., Mikhailovich V.M., Nicot F., Dubois M., Zasedatelev A.S., Izopet J. Method for identifying the genotype and subtype of hepatitis C virus on a biological microchip. *International Application Number PCT/RU2007/000438*.
- Darii E., Lebeau D., Papin N., Rubina A.Y., Stomakhin A., Tost J., Sauer S., Savvateeva E., Dementieva E., Zasedatelev A., Makarov A.A. and Gut I.G. Quantification of target proteins using hydrogel antibody arrays and MALDI time-of-flight mass spectrometry (A2M2S). *New Biotechnology*. 2009 (in press).
- Khodakov D.A., Zakharova N.V., Gryadunov D.A., Filatov F.P., Zasedatelev A.S., Mikhailovich V.M. An oligonucleotide microarray for multiplex real-time PCR identification of HIV-1, HBV, and HCV. *Biotechniques*. 2008. 44. 241–248.
- Karpenko I.L., Jasko M.V., Andropova V.L., Ivanov A.V., Kukhanova M.K., Galegov G.A., Skoblov Y.S. Synthesis and antihyperthermic activity of acyclovir phosphonates. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2003. 22. 319–328.
- Юбилейная брошюра, посвященная 50-летию образования Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН.

# Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН

(Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН до 2003 года)

**В**есной 1957 года постановлением Совета министров СССР было организовано Сибирское отделение Академии наук СССР. Первоначально в состав новой крупной структуры входило 10 институтов, относящихся к различным областям естественных наук. При создании комплекса научных центров Сибирского отделения академии наук СССР не было предусмотрено создания института, ориентированного на решение задач физико-химической биологии. Эта новая область науки еще пребывала в числе изгоев, поскольку руководивший страной в то время Н.С. Хрущев находился под влиянием шарлатанских идей Лысенко Т.Д. Поэтому организатор Сибирского отделения Михаил Алексеевич Лаврентьев смог решиться лишь на создание Института цитологии и генетики



(ИЦИГ) под руководством академика Николая Петровича Дубинина, который, несомненно, понимал значение методов химии и физики для развития современной биологии. Даже эта завуалированная попытка организовать работы по молекулярной биологии не сработала – Хрущев лично приехал в Академгородок и снял Николая Дубинина с поста директора ИЦИГа. Спасти институт удалось, поставив директором Дмитрия Константиновича Беляева, прогрессивного генетика, занимавшегося пушными зверьями – этот товар был понятен нашему верховному руководству больше, чем мушка-дрозофила, на которой в наибольшей мере развивались фундаментальные основы генетики. Судьбой отечественной биологии в то время были, естественно, обеспечены многие видные ученые. В их числе был и Николай Николаевич Ворожцов – крупный химик-органик, которому была поручена организация в составе Сибирского отделения Института органической химии (НИОХ). Собирая костяк института из своих учеников, выпускников кафедры промежуточных соединений и красителей, он пригласил, в том числе, и Дмитрия Георгиевича Кнорре, которому очень хотелось применить свои химические знания к проблемам, связанным с науками о жизни. Н.Н. Ворожцов поддержал это желание молодого ученого и сразу же согласился создать лабораторию природных полимеров. Название было осторожное – еще нависала над биохимией черная тень лысенковщины, и присутствие «крамольных» слов вроде белков, и в особенности нуклеиновых кислот, в названии лаборатории было небезопасно. Но мысль о создании нового научного направления в Сибирском отделении прочно завладела помыслами Н.Н. Ворожцова, и уже в 1964 году он добился у Михаила Алексеевича Лаврентьева решения о строительстве специального корпуса для биохимических работ. В конце 1969 года корпус был построен, в нем разместился отдел биохимии. А лаборатория природных полимеров получила свое незамаскированное название – она стала лабораторией химии нуклеиновых кислот, вместе с созданной к тому времени лабораторией ультрамикробиохимии, образо-

вав отдел биохимии НИОХ СО РАН. По замыслу Ворожцова новый отдел должен был объединиться с лабораторией Рудольфа Иосифовича Салганика – ведущего ученого-биохимика, работавшего в ИЦИГ СО РАН. Это позволило бы создать специальный институт. К сожалению, намечавшийся Николаем Николаевичем вариант создания нового института не был реализован. Это, впрочем, не помешало прочному и продуктивному сотрудничеству Д.Г. Кнорре и Р.И. Салганика, в частности, в организации ряда биохимических производств, в которых в то время остро нуждалась отечественная биохимия, крайне ограниченная в возможности покупать нужные препараты и приборы за валюту.

К вопросу организации нового института удалось вернуться, когда получил высокий пост вице-президента Академии наук СССР и, что не менее важно, приобрел высокий авторитет в правительственных и партийных кругах академик Юрий Анатольевич Овчинников. Он уже давно ратовал за создание такого института в Сибири. Этой же точки зрения придерживался и незадолго до этого ставший председателем Сибирского отделения академик Валентин Афанасьевич Коптюг. В результате в очередном Постановлении ЦК КПСС и Совета Министров СССР от 24 июня 1981 г. № 662 «О дальнейшем развитии физико-химической биологии и биотехнологии и использовании их достижений в медицине, сельском хозяйстве и промышленности» одним из пунктов было записано создание Новосибирского института биоорганической химии (НИБХ). После определенной подготовительной деятельности 1 апреля 1984 года институт был официально утвержден, а его директором стал Дмитрий Георгиевич Кнорре.

Создание НИБХ СО РАН сыграло важную роль в становлении физико-химической биологии в Сибири. На базе НИБХ и лаборатории Р.И. Салганика была организована кафедра молекулярной биологии на факультете естественных наук Новосибирского государственного университета (НГУ), выпустившая не одну сотню молодых специалистов. Это не только обеспечило два

основных биологических института пополнением молодыми кадрами, но и создало возможность формирования других научных организаций биохимического профиля. В частности, это, несомненно, сыграло большую роль в том, что при выборе места для создания крупного центра по вирусологии Главмикробиопром остановился на районе, примыкающем к Новосибирскому академгородку, в результате чего и возник наукоград Кольцово – центр по изучению и созданию средств по профилактике различных, в том числе и особо опасных вирусных инфекций (ныне – государственный научный центр вирусологии и бактериологии «Вектор»).

В 1996 году в связи с достижением 70-летнего возраста Д.Г. Кнорре покинул пост директора института, и новым директором был выбран ученик Д.Г. Кнорре член-корреспондент РАН Валентин Викторович Власов (ставший в 2003 году академиком РАН). Считая важнейшей областью приложения физико-химической биологии вопросы медицины, он усилил это направление в тематике работ института, создал при институте Отдел новых медицинских технологий. Поэтому в 2003 г. институт получил новое название – Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (ИХБФМ).

В настоящее время ИХБФМ является основной базой по подготовке кадров всех уровней квалификации в области физико-химической биологии – от выпускников Вуза до кандидатов и докторов наук. Среди выпускников кафедры молекулярной биологии – академик Валентин Викторович Власов, члены-корреспонденты РАН Ольга Ивановна Лаврик и Сергей Викторович Нетесов. Большое значение для подготовки кадров высшей квалификации имела организация при Институте ученого совета по защитах кандидатских и докторских диссертаций, на котором защищено уже более 200 работ. Институт продолжает активно участвовать в подготовке студентов и аспирантов по различным специальностям химического и биологического профиля. В Институте функционирует аспирантура по трем специально-

стям, в которой каждый год проходит обучение около 40 человек.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН известен высоким уровнем научных исследований, имеет мощный научный потенциал, превосходный парк современного исследовательского оборудования. Институт является одним из признанных лидеров среди организаций биологического профиля в Сибирском отделении РАН и в России в целом. Ежегодно сотрудники Института публикуют более 150 научных работ в ведущих российских и международных рецензируемых журналах.

В настоящее время в структуру Института входят: 16 лабораторий и исследовательских групп; два отдела, отдел молекулярной и клеточной биологии и Центр новых медицинских технологий. В Институте работает около 200 научных сотрудников, в том числе: 3 академика РАН, 1 член-корреспондент РАН, 18 докторов наук, 78 кандидатов наук. Более половины от общего числа научных сотрудников – молодые ученые в возрасте до 35 лет. Ряд работ, выполненных в стенах Института, удостоен высших наград

страны: Ленинской премии; двух Государственных премий в области науки и техники; премии Правительства РФ в области образования; а также целого ряда других престижных российских и международных премий, включая премии для молодых ученых.

Основными направлениями деятельности Института являются:

- исследование структуры и функции биомолекул и надмолекулярных комплексов, создание средств направленного воздействия на генетические структуры; биоинженерия, синтез биополимеров и синтетическая биология.
- биотехнологии: генотерапия, клеточные технологии регенеративной медицины, нанобиотехнологии.
- клиническая физиология, генетические основы персонализированной медицины, молекулярные основы иммунитета и онкогенеза.
- экология организмов и сообществ, сообщества экстремофильных микроорганизмов, вирусные и бактериальные агенты в организме млекопитающих.

В число крупных научных результатов, полученных за четверть века

существования Института, несомненно, входят:

- создание фундаментальных основ получения ген-направленных биологически активных соединений. Разработка эффективных методов синтеза фрагментов нуклеиновых кислот, их аналогов и производных.
- разработка методов анализа структуры и функций сложных надмолекулярных ансамблей на основе биополимеров.
- создание технологической базы для диагностики генетических и инфекционных заболеваний и расшифровки структуры геномов биологических объектов. Разработка новых молекулярных инструментов и методов диагностики онкологических, аутоиммунных и инфекционных заболеваний.

Таким образом, пройдя стадии становления и развития, после 25 лет плодотворной деятельности Институт имеет свое лицо, прочно стоит на ногах и активно проводит научные исследования, делая ставку на молодых ученых и опыт замечательных научных школ, созданных в его стенах. ●

# Морские природные соединения. Путь к новым лекарственным препаратам

**В.А. Стоник**

Тихоокеанский институт биоорганической химии Дальневосточного отделения РАН,  
690022, Владивосток, проспект 100-летия Владивостока, 159  
E-mail: Stonik@piboc.dvo.ru

**РЕФЕРАТ** В статье обсуждены результаты изучения природных соединений морского происхождения, которые были использованы или используются в настоящее время для создания новых лекарственных препаратов. Рассмотрены морские природные соединения с противоопухолевым и обезболивающим свойствами, с ранозаживляющей и противовоспалительной активностями, соединения, обладающие антивирусным и противомикробным действием, и другие биологически активные вещества морских организмов. Показано, что изучение морских природных соединений привело к созданию противоопухолевых препаратов «Цитарабин», «Видарабин», «Трабектидин», обезболивающего лекарственного средства «Приалт», отечественных лекарственных препаратов серии «Гистохром», уменьшающих зону некроза после инфаркта миокарда и последствия кровоизлияний в глаз, а также противоожогового средства «Коллагеназа КК». Около сорока морских природных соединений и их производных находятся на разных этапах доклинического и клинического тестирования. Библиография – 86 ссылок.

**Ключевые слова:** морские организмы, природные соединения, физиологическая активность, трабектидин, приалт, гистохром, коллагеназа КК.

**Список сокращений:** ВИЧ – вирус иммунодефицита человека, СПИД – синдром приобретенного иммунодефицита, ТИБОХ – Тихоокеанский институт биоорганической химии Дальневосточного отделения Российской академии наук, ЕС<sub>50</sub> – концентрация, соответствующая 50 %-ному эффекту вещества, IC<sub>50</sub> – концентрация, вызывающая 50 %-ное ингибирование, VEGF – сосудистый эндотелиальный фактор роста.

## ВВЕДЕНИЕ

Низкомолекулярные природные соединения в своем большинстве относятся к т.н. вторичным метаболитам. В отличие от первичных метаболитов, такие вещества имеют ограниченное распространение и могут быть найдены только в отдельных таксонах, иногда даже в одном биологическом виде (подвиде, штамме). Они образуются из предшественников, участвующих в первичном метаболизме, таких как уксусная кислота, аминокислоты, глюкоза, и являются в основном конечными продуктами биохимических превращений. По химическому строению вторичные метаболиты весьма разнообразны, к ним относятся стероиды и терпеноиды, алкалоиды и поликетиды, фенольные метаболиты и некоторые углеводы, различные липиды и пептиды. По биологическому значению принято выделять гормоны, антибиотики, токсины, феромоны и другие группы вторичных метаболитов. Среди природных соединений имеются эндометаболиты, т.е. вещества, выполняющие свои биологические функции в самих организмах-продуцентах, например оксилипины, гормоны, фитоалексины, и более многочисленные экзометаболиты, выделяемые в окружа-

ющую среду и имеющие важное экологическое значение, в их числе токсины, антибиотики, различные сигнальные соединения.

Главными биологическими источниками природных соединений долгое время являлись высшие наземные растения и почвенные микроорганизмы, а после изобретения и широкого распространения легководолазной техники ими стали и разнообразнейшие морские организмы. Изучение морских организмов заметно расширило число известных природных соединений. В самом деле, если общее число изученных природных соединений, по-видимому, не превышает 120–150 тыс., а по оценкам многих специалистов – существенно ниже этой цифры [1], то в морских организмах было открыто около 20 тыс. таких веществ. Причем первых исследователей весьма удивляло то обстоятельство, что в морских организмах исключительно редко находили ранее известные соединения. Таким образом, биохимия их вторичного обмена существенно отличается от таковой наземных обитателей. Главное объяснение этому факту лежит в существенных таксономических различиях между наземными и морскими животными, растениями и микроорганизмами.

В целом, изучение природных соединений имеет важное экологическое значение, способствует развитию органического синтеза, физико-химических и разделительных методов, стимулирует другие науки, такие как биохимия, молекулярная генетика, биотехнология и микробиология, оно тесно связано со здоровым питанием.

Природные соединения сыграли и продолжают играть выдающуюся роль в создании новых лекарств и развитии фармацевтической промышленности во всем мире. Обезболивающие препараты на основе морфина из опийного мака, сердечно-активные препараты из гликозидов дигиталиса, противовоспалительные средства, созданные при изучении стероидных гормонов, антибиотики и многие другие – перечень лекарств, созданных на основе использования самих природных соединений или их производных и аналогов, включает около 50 % всех известных на сегодня медицинских препаратов [5].

В настоящей статье рассматриваются результаты исследования природных соединений морского происхождения, которые были использованы или используются сейчас для создания новых лекарственных препаратов.

### МОРСКИЕ ПРИРОДНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ С ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМИ СВОЙСТВАМИ

С началом использования акваланга морские организмы все чаще стали попадать в руки химиков-природников. Американский ученый Вернер Бергман был одним из первых, кто начал их химическое изучение. В 1951 г. он сообщил о выделении из губок *Cryptotethia crypta*, собранных у побережья Флориды, необычных нуклеозидов (спонготимидин (1) и спонгоуридин (2), рис. 1, а затем и ряда других) [2–4], содержащих арабинозные остатки вместо рибозных или дезоксирибозных, как в большинстве соединений этого класса. Эти работы стимулировали появление в фармакологии концепции антиметаболитов. Антиметаболитами стали называть активные субстанции лекарств, имеющие не только значительное сходство с метаболитами человека, но и существенные структурные различия. Антиметаболиты включаются в биосинтез тех или иных биополимеров, чаще всего ДНК, и тормозят его, проявляя противоопухолевые и противовирусные свойства. После открытия Бергмана были разработаны два арабинонуклеозидных медицинских препарата: арабиноаденин (3) («Ага-А», «Видарабин») и арабиноцитозин (4) («Ара-С», «Цитарабин»), рис. 1, которые на протяжении десятков лет применяются в клинической практике в качестве противоопухолевых и противовирусных лекарств. Еще несколько лекарств нуклеозидной природы («Азидотимидин», «Ацикловир» и др.) отличаются от «обычных» нуклеозидов другими структурными особенностями. Например, «Азидотимидин» имеет в моносахаридном остатке азидную группу, а «Ацикловир» – разомкнутый фуранозный цикл.

Однако дальнейшая разработка противоопухолевых лекарств на основе морских природных соединений шла не так успешно. И дело не в том, что не было найдено соединений с высокими противоопухолевыми активностями. Наоборот, в некоторых морских беспозвоночных были обнаружены минорные вторичные метаболиты, обладающие экстремально высокой токсичностью для опухолевых клеток. По своей цитотоксичности они в сотни–тысячи

раз превосходят большинство из ныне применяемых противоопухолевых лекарств. Например, спонгистатин (5), рис. 2, из морских тропических губок – самое активное из всех природных и синтетических соединений, найденное за всю историю изучения противоопухолевых веществ в Национальном институте рака (США). Его присутствие в одной из губок сначала обнаружили по биологической активности соответствующих экстрактов, но само это соединение долго не могли выделить в количествах, необходимых для структурного изучения. Только после сбора и переработки 3 т губки удалось наконец получить 0.8 мг спонгистатина. Затем в качестве исходного материала использовали другую губку, собранную возле Мальдивских островов, и после переработки 400 кг получили еще 10 мг спонгистатина, завершили установление его строения и приступили к изучению особенностей физиологического действия этого макролида. Ингибирующая доза, вызывающая 50 %-ную гибель опухолевых клеток ( $IC_{50}$ ), была равна  $10^{-10}$  М (в отношении клеток рака прямой кишки) и  $10^{-12}$  М (в отношении клеток рака молочной железы). В опытах на животных, имеющих смертельные злокачественные опухоли, при введении спонгистатина в дозе 25 мкг/кг наблюдали их 70 %-ное выживание.

Всего же было найдено несколько десятков экстремально токсичных для опухолевых клеток морских метаболитов. Очень важно, что многие из них относятся к принципиально новым структурным сериям противоопухолевых веществ, что открывает хорошие перспективы для синтетического моделирования. До открытия этих веществ все применяемые в химиотерапии природные соединения относились не более чем к 4–5 структурным типам.

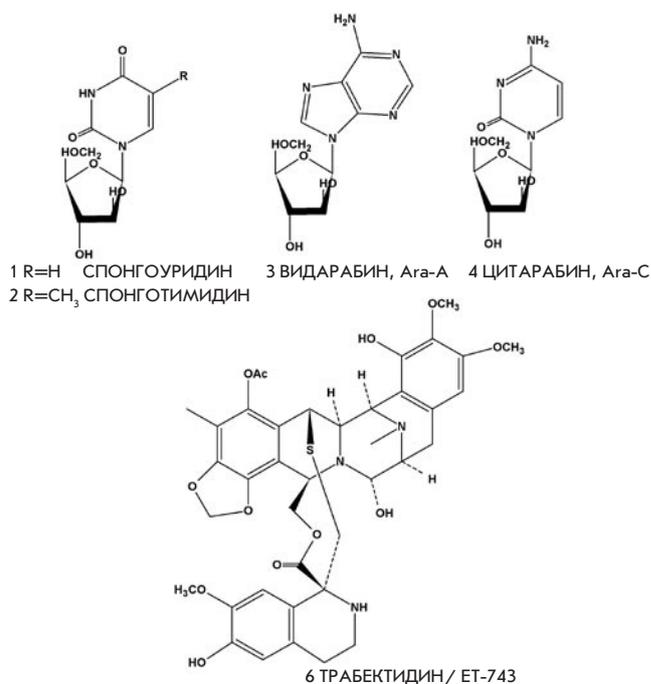


Рис. 1. Противоопухолевые и противовирусные лекарства, созданные на основе морских природных соединений

В то же время создание на основе морских природных соединений медицинских препаратов нового поколения тормозится рядом осложняющих моментов. Во-первых, такие вещества часто труднодоступны. Достаточные для широкого использования количества невозможно получить из самих морских организмов, так как их продуценты, как правило, являются редкими и рассеянными видами, а способы марикультурирования таких биологических объектов в большинстве случаев не разработаны. Экономически приемлемые синтезы для большинства этих веществ также до сих пор не созданы из-за сложности их структур и обилия в них асимметрических центров. Во-вторых, не всегда эти высокотоксичные для опухолевых клеток соединения показывают хорошую противоопухолевую активность на животных и людях. Наконец, в-третьих, некоторые из них обладают побочными эффектами, в т.ч. вызывают поражение почек или других органов и систем, что исключает их клиническое применение.

Тем не менее недавно была успешно завершена разработка еще одного противоопухолевого лекарства морского происхождения. В конце 2007 года препарат «Трабектидин» («Джонделис») был разрешен к применению в странах Европейского союза для лечения сарком мягких тканей. Строение соответствующей активной субстанции, алкалоида эктейнасцидина-743 (ЕТ-743) (6), рис. 1, из асцидии *Ecteinascidia turbinata* было установлено независимо друг от друга двумя группами американских ученых 18 лет назад [7, 8]. Их статьи были опубликованы в одном номере «Журнала органической химии» (Journal of Organic Chemistry). В то же время высокая противоопухолевая активность экстракта *E. turbinata* была известна задолго до этого, с 1969 года. Токсичная концентрация ( $IC_{50}$ ) этого вещества для опухолевых клеток L-1210 была очень низкой (0.5 нг/мл), а в микрограммовых дозах (на кг веса подопытных животных) оно показывало высокую противоопухолевую активность на различных моделях мышинного рака.

Многостадийные полные синтезы этого вещества не могли обеспечить исследователей достаточным количеством материала для испытаний этого соединения. Например, суммарный выход в первом таком синтезе был менее 1% [9]. Поэтому были разработаны методы культивирования этой асцидии и созданы подводные плантации у берегов Испании, однако и такой метод получения исходного биологического материала был не вполне пригодным из-за больших колебаний в содержании эктейнасцидинов, необходимых для клинических исследований, в культивируемых асцидиях. Наконец, после многих лет поиска, был найден эффективный подход к получению этого вещества – синтез из антибиотика цианосафракцина В, продуцируемого с хорошим выходом наземной бактерией *Pseudomonas fluorescens* [10].

Механизм биологического действия активной субстанции «Трабектидина» – эктейнасцидина-743 – на опухолевые клетки связан с его способностью проникать в малую бороздку ДНК и алкилировать остатки гуанозина [11]. Кроме того, он вызывает программируемую гибель (апоптоз) опухолевых клеток и усиливает противоопухолевое действие ряда известных лекарств («Доксорубина», «Паклитакселя» (таксола) и др.). Хотя препарат разрешен пока только для лечения сарком мягких тканей, в процессе его

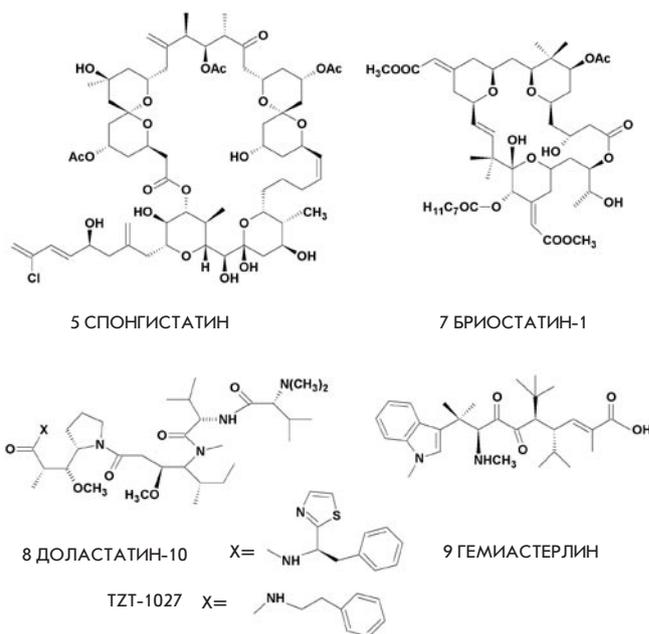


Рис. 2. Некоторые соединения, которые тестируются в качестве активных субстанций противоопухолевых препаратов

клинических испытаний были получены замечательные результаты и при лечении некоторых других видов злокачественных опухолей. Недавно компания Pharmamar (Испания), разработавшая «Трабектидин», продала лицензию для его продвижения на американский рынок компании Johnson&Johnson/Ortho Biotech.

Ряд других морских природных соединений с экстремально высокой противоопухолевой активностью, во многих случаях сравнимой с активностью спонгистатина и эктейнасцидина, изучаются сейчас в качестве потенциальных противоопухолевых лекарств и находятся на разных стадиях клинического и доклинического тестирования [12, 13] (табл.).

Например, бриостатин-1 (7) (рис. 2), 26-членный макроциклический лактон из мшанки *Begula neritina*, распространенного в Мировом океане обрастателя доков и пирсов, был выделен группой Петита из Университета штата Аризона после ряда повторных сборов биологического материала. Его структуру установили с помощью рентгеноструктурного анализа. Соединение (7) имеет 11 асимметрических центров и вряд ли в ближайшие годы может быть получено с приемлемым выходом путем органического синтеза. Его содержание в мшанке очень мало (0.00001%), хотя из 10 тыс. галлонов собранной мшанки все же удалось получить 18 г бриостатина, необходимого для доклинических и клинических исследований. Показано, что это вещество является модулятором протеинкиназы С, иммуностимулятором и индуцирует клеточную дифференциацию. Оно усиливает противоопухолевое действие ряда лекарств, но вызывает в качестве побочного эффекта миалгию. В настоящее время продолжаются клинические испытания этого препарата в комбинациях

с «Паклитакселем», «Винкристином», «Ага-С» и другими препаратами.

Доластатин-10 (8) (рис. 2) был открыт после экспедиции профессора Петита на остров Маврикий в 1972 году, когда был собран морской голожаберный моллюск *Dolabella auricularia* и обнаружена высокая противоопухолевая активность его экстракта. Чтобы получить первый миллиграмм активной компоненты экстракта – соединения (8), понадобился повторный сбор гигантского количества этого редкого моллюска – около 2 т, столь малым было содержание в нем этого вещества. Доластатин-10 оказался линейным пентапептидом, имеющим остатки четырех ранее неизвестных аминокислот: N,N-диметилвалина, долаизолейцина, долапроина и долафенина [14]. В 1989 году был осуществлен полный синтез этого пептида, подтвердивший предложенное для него строение и установивший его абсолютную стереохимию [15]. Доластатин экстремально токсичен для опухолевых клеток, его полукотическая концентрация ( $IC_{50}$ ) в отношении клеток лимфоцитарной лейкемии P-388 равна  $4.5 \cdot 10^{-5}$  мкг/мл, однако во время клинических испытаний на их первой и второй стадиях его высокая противоопухолевая активность не нашла убедительного подтверждения. Недавно клинические испытания доластатина были прекращены.

В то же время работы по созданию на его основе противоопухолевого лекарства не остановились. Было найдено, что синтетическое производное доластатина, TZT-1027, в котором долафениновый аминокислотный остаток был заменен на фенилаланиновый, так же как и доластатин, является мощным ингибитором полимеризации тубулина, останавливает деление опухолевых клеток в очень низких концентрациях и, кроме того, уменьшает кровоснабжение опухолей (ингибирует ангиогенез). Сейчас TZT-1027 («Соблидотин») проходит клинические испытания в Японии, Европе и США при лечении некоторых солидных опухолей, в т.ч. резистентных к другим препаратам [16].

Гемиастерлин (9) (рис. 2) представляет собой трипептид, впервые выделенный из губки *Hemiastrella minor* Кашманом и сотрудниками в 1986 году [17]. Его синтетический аналог НТИ-286 с фенильным заместителем вместо N-метилендола оказался более активным и в наномолярных концентрациях ингибировал деление опухолевых клеток, связываясь с мономерными единицами тубулина и затрудняя его полимеризацию [18]. В доклинических испытаниях он показал хорошую активность на опухолях, резистентных к «Паклитакселю» – одному из лучших применяемых сейчас противоопухолевых препаратов. Однако клинические испытания не подтвердили его активности на больных с терминальными стадиями рака. Недавно было показано противоопухолевое действие этого препарата в отношении гормонзависимых опухолей, что возродило интерес к дальнейшему клиническому изучению НТИ-286 [19].

Дискодермолид (10) (рис. 3) был выделен в 1990 году [20] сотрудниками Харбор Брэнч Института океанографии (штат Флорида, США) из редкой глубоководной губки *Discodermia disollata*, собранной у Багамских островов на глубине 300 м с помощью обитаемого подводного аппарата. Химическое строение соединения (10) было установлено с помощью тщательного анализа ЯМР-спектров и рентгеноструктурного анализа и подтверждено синтезами самого дискодермолида [22] и его энантиомера (–)-дискодермолида [21], который, в отличие от природного (+)-изомера, оказался значительно менее активным в качестве потенциального противоопухолевого агента. В самом деле, природный дискодермолид останавливал развитие опухолевых клеток на стадиях G2/M клеточного цикла в концентрациях 3–80 нМ, тогда как (–)-изомер действовал в 2–20 раз слабее. Препарат оказался намного более сильным ингибитором полимеризации тубулина, чем «Паклитаксель», кроме того, их совместное действие было более сильным, чем действие каждого из этих агентов. После многократных

Таблица. Некоторые морские природные соединения – потенциальные противоопухолевые лекарства

Соединение	Биологич. источник	Химическая природа	Механизм действия	Компания	Статус
Бриостатин-1 (7)	Мшанка	Поликетид	Ингибитор протеинкиназы	GPC Biotech	II-фаза клинических испытаний
Доластатин-10 (8)	Моллюск	Пептид	Ингибитор образования микротрубочек	NCI-Knoll	II-фаза клинических испытаний производного TZT-1027
НТИ286 (9)	Губка	Трипептид	»	Novartis	Продолжение клинических испытаний
Дискодермолид (10)	»	Поликетид	»	Novartis	II-фаза клинических испытаний
Криптофицин (11)	Циано-бактерия	Циклический депсипептид	»	Eli Lilly	Снят с фазы II клинических испытаний
Аплидин (12)	Асцидия	Циклический депсипептид	Вызывает окислительный стресс клеток	PharmaMar	II-фаза клинических испытаний
Эрибулин мезилат (13)	Губки	Полиэфирное производное	Ингибитор образования микротрубочек	Esai Company	III-фаза клинических испытаний
Скваламин (14)	Акула	Стероид	Ингибитор ангиогенеза	Genaera	Снят с фазы II клинических испытаний
Кохалалид F (15)	Моллюск	Циклический депсипептид	Обладает лизосоматропным действием	PharmaMar	II-фаза клинических испытаний
Салиноспирамид А (16)	Морская бактерия	Лактам-лактонное производное	Протеосомный ингибитор	Nereus	II-фаза клинических испытаний

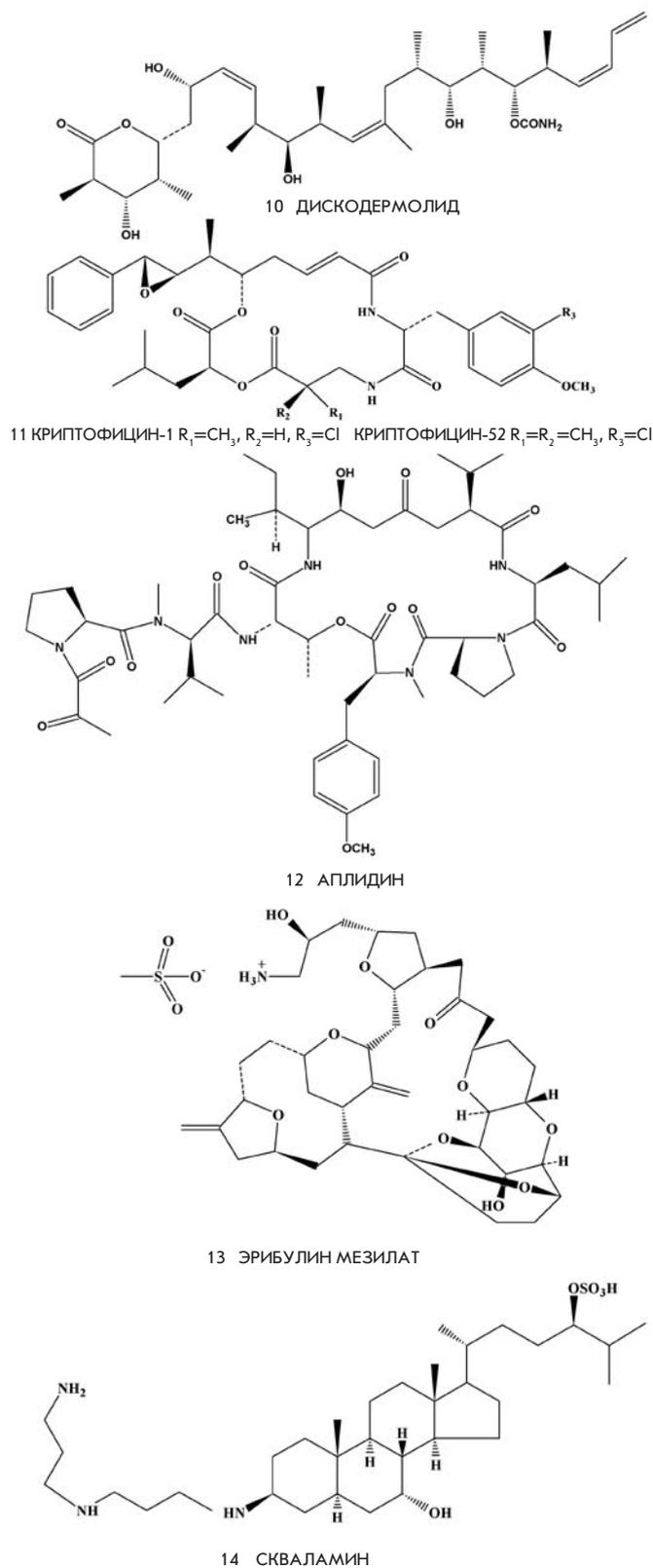


Рис. 3. Некоторые соединения, которые тестируются в качестве активных субстанций противоопухолевых препаратов

улучшений различных вариантов многостадийных синтезов дискодермолида сотрудниками фармацевтической компании Novartis им удалось, наконец, получить 20 г этого вещества и приступить в 2004–2005 годах к завершению доклинических и началу клинических исследований. К настоящему времени эти испытания приостановлены из-за того, что хотя препарат оказался относительно малотоксичным для больных, однако все же был недостаточно эффективным. Тем не менее сохраняются перспективы его применения в комбинациях с другими противоопухолевыми лекарствами [13].

К тубулинсвязывающим агентам относятся также криптофицины и родственные им природные соединения. Криптофицины являются депсипептидами, продуцируемыми цианобактериями *Nostok* spp. [23]. Свое название они получили из-за того, что показывали сильную ингибирующую активность в отношении патогенных бактерий *Styrotococcus* spp. Однако еще большее внимание привлекли их противоопухолевые свойства. Например, криптофицин-1 (11) (рис. 3) был токсичен для опухолевых клеток в концентрациях от 1 до 10 пг/мл. Полный синтез криптофицина-1 [24] привел к уточнению его структуры и позволил компании Eli Lilly приступить к созданию на его основе противоопухолевого лекарства. В частности, синтетический аналог криптофицина-1, т.н. криптофицин-52, был более активным в отношении опухолевых клеток, чем винкапептиды и «Паклитаксель», в 40 и 400 раз соответственно. Однако в клинических испытаниях он оказался высокотоксичным для пациентов. Испытания пришлось остановить в конце 90-х годов прошлого века. Позже были получены новые производные – криптофицины-309 и криптофицины-249, доклинические исследования которых в настоящее время находятся на завершающей стадии [13].

Несколько высокоактивных депсипептидов из асцидий, включая дидемнин В из *Trididemnum solidum* [25], интенсивно изучались в течение многих лет в качестве потенциальных противоопухолевых средств. Однако в середине 90-х годов прошлого века клинические исследования дидемнина В были остановлены из-за значительной нервно-мышечной токсичности и отсутствия существенных эффектов на больных в терминальных стадиях. Однако его аналог аплидин (12) (дегидродидемнин В) (рис. 3) из средиземноморской асцидии *Aplidium albicans* индуцирует в опухолевых клетках окислительный стресс с последующим апоптозом [26]. Он же является ингибитором ангиогенеза и нарушает кровоснабжение опухолей. Хотя этот препарат находится на второй стадии клинических испытаний в качестве средства лечения миеломы, до сих пор не имеется хорошего способа его получения, поскольку ни технология культивирования соответствующей асцидии, ни приемлемый для его наработки в больших количествах синтез до сих пор не разработаны [13].

В 1986 году Уемура и Хирата выделили из губки *Halichondria okadae* несколько минорных метаболитов, названных халихондринами [27]. Эти соединения были мощными ингибиторами развития опухолевых клеток ( $IC_{50}$   $10^{-9}$  М), связывались с тубулином по тому же сайту, что и применяемые в клинике винкапептиды, и были отобраны для дальнейшего изучения их противоопухолевых свойств. Однако их наработка в достаточных количествах для этих целей

была чрезвычайно трудной. Из-за сложности структуры полный синтез халихондрин В, разработанный в 1992 году [28], был 90-стадийным и не мог решить эту задачу. Приблизительно в то же время новозеландскими учеными был найден новый источник халихондринов – глубоководная губка *Lissodendoryx* n. sp.1. Тонна этой губки была заготовлена тралением. Кроме того, на мелководье Новой Зеландии были созданы плантации *Lissodendoryx*, хотя содержание целевых веществ в культивируемой губке было намного меньшим, чем в дикорастущей [29]. Эти усилия привели к получению 310 мг халихондрин В и началу в 2002 году его клинических испытаний. Затем японскими учеными в сотрудничестве с Esai Company было обнаружено, что значительно более простое производное халихондрин – эрибулин мезилат (**13**) (рис. 3) – обладает такой же биологической активностью. В настоящее время выполняется III фаза клинических исследований эрибулин мезилата как потенциального средства лечения рака молочной железы [13]. Кроме того, проводятся его клинические испытания при лечении рака предстательной железы и саркомы.

Водорастворимый аминостероид скваламин (**14**) (рис. 3) был выделен из печени акулы *Squalus acanthius* в 1993 году. Это вещество проявляет сильное противомикробное действие [30, 31]. Позднее было установлено, что оно ингибирует ангиогенез и останавливает опухолевый рост на различных моделях мышинного рака [32]. Компания Genaeга организовала его фармакологические исследования, однако на второй стадии клинического тестирования (рак легких и рак яичников) его противоопухолевые свойства были признаны недостаточными. Тем не менее было показано, что скваламин усиливает терапевтический эффект «Паклитаксела» и «Карбоплатина», ингибируя некоторые факторы роста, например VEGF, и вызывая уменьшение числа кровеносных сосудов вокруг опухоли и апоптоз опухолевых клеток. Более того, было установлено, что его физиологические эффекты могут оказаться полезными для лечения заболеваний пожилого возраста, связанных с нарушениями зрения (макулярная дегенерация) [33, 34].

Исследования моллюска *Elysia rufescens* под руководством Шоера в Гавайском Университете США привело к открытию ряда новых высокоактивных депсипептидов, включая кохалалид F (**15**) (рис. 4) [35]. Этот моллюск питается водорослями *Bryopsis* spp., настоящими продуцентами кохалалида. Моллюск накапливает это биологически активное вещество как средство химической защиты от хищников, причем содержание кохалалида в нем приблизительно в 5000 раз выше, чем в водорослях. После твердофазного синтеза этого пептида его структура и относительная стереохимия были скорректированы [36], и компания PharmaMag приступила к его доклиническому, а затем и клиническому изучению.

Кохалалид индуцирует образование вакуолей в некоторых опухолевых клетках и стимулирует лизосомы. Он в несколько раз более токсичен для опухолевых, чем для нормальных клеток [37]. Несмотря на то что механизм противоопухолевого действия кохалалида до сих пор окончательно не установлен, в настоящее время продолжается II фаза его клинических испытаний при лечении устойчивых к другим средствам солидных опухолей [13].

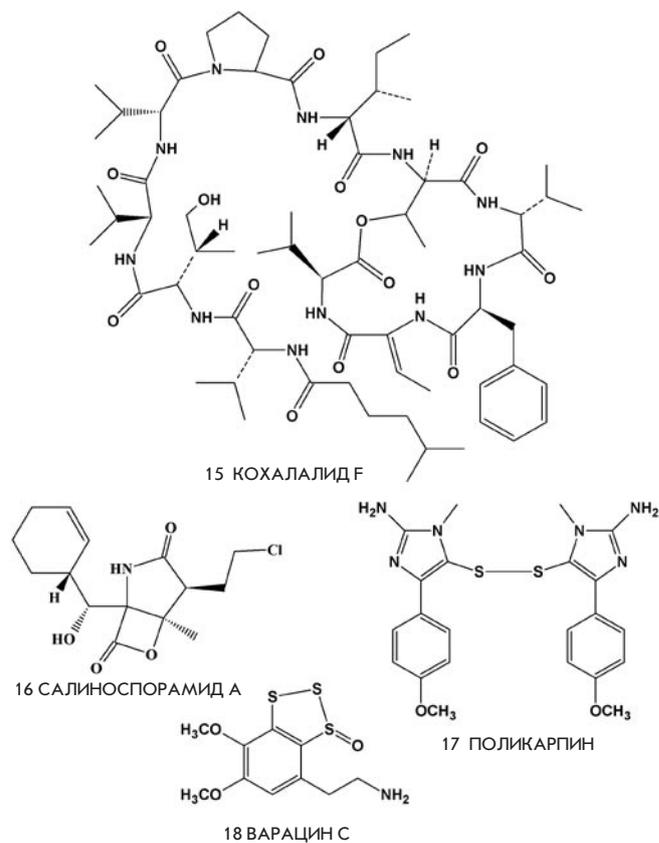


Рис. 4. Некоторые соединения, которые изучаются в качестве активных субстанций противоопухолевых лекарств

Салиноспорамид А (**16**) (рис. 4) был выделен в 2003 году Феникалом и сотрудниками (Скрипсовский институт океанографии, Калифорния, США) из галофильной морской бактерии, относящейся к новому роду бактерий-актиномицетов, названному *Salinispora* [38]. Он ингибирует р26 протеосомы [39], для этого вещества под шифром NPI-0052 фармацевтической компанией Nereus Pharmaceuticals (США) недавно была завершена первая стадия клинических испытаний при лечении множественной миеломы [13].

Кроме вышеперечисленных, еще несколько морских природных соединений изучались в клинике в качестве потенциальных противоопухолевых агентов. К ним относятся: пептид цематидин из моллюсков, пептид ILX-65, близкий к доластатину, и трипептид E-7974 из морской губки, ингибирующие полимеризацию тубулина [5, 13, 40] (Knoll); производное аминокислоты LAF389, являющееся ингибитором метионин-аминопептидазы (Novartis); синтетический аналог цереброзидов губок KRN7000, обладающий иммуностимулирующим и сильным противоопухолевым действиями для пациентов, сохранивших высокий уровень NK клеток. Перспективы дальнейшего клинического изучения этих веществ пока не ясны.

В России были выделены алкалоиды из асцидий поликарпин (**17**) (рис. 4) [41] и варацин С (**18**) [42], обладающие

высокой токсичностью в отношении опухолевых клеток, причем соединение (18) превосходит по своей цитотоксичности известный «Доксорубин» и более активно в кислотной среде, с чем связана некоторая его избирательность в отношении опухолей по сравнению с нормальными тканями [43]. В самом деле, известно, что многие опухоли подкисляют себя из-за повышенного гликолиза.

Поликарпин и его многочисленные синтетические аналоги вызывают апоптоз опухолевых клеток, усиливая фосфорилирование белка p53 по аминокислотному остатку Ser-15 [44], однако они оказались довольно токсичными для животных. Варацин С вскоре после его выделения был синтезирован [43], а недавно в нашей стране начались работы по синтезу его аналогов, которые уже привели к получению нескольких высокоактивных соединений, перспективных для дальнейшего изучения в качестве кандидатов в лекарственные препараты [45].

Таким образом, среди отобранных для доклинических и клинических испытаний веществ большинство являются мощными ингибиторами полимеризации тубулина. Кроме того, среди них имеются ингибиторы протеинкиназы (бриостатин), других ферментов (LAF-389), ингибиторы протеосом (NPI-0052), агенты, взаимодействующие с ДНК («Джонделис»), ингибиторы ангиогенеза (аплизин, кохалид, скваламин), вещества с неустановленным механизмом действия. Принимая во внимание большое разнообразие структур высокоактивных морских метаболитов и различные механизмы их противоопухолевого действия, можно выразить уверенность, что дальнейшие усилия по созданию противоопухолевых препаратов на основе морских природных соединений приведут к новым успехам.

### МОРСКИЕ ПРИРОДНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ, ОБЛАДАЮЩИЕ ОБЕЗБОЛИВАЮЩИМИ СВОЙСТВАМИ

Первый обезболивающий препарат на основе морских природных соединений получил название «Зиконотид» («Приалт»). Он был создан после двадцатилетних исследований токсинов хищных моллюсков-гастропод, относящихся к роду *Conus*. В конце 2004 года это вещество под торговым названием «Приалт» было разрешено к производству и клиническому применению в США, а несколькими месяцами позже – в Европе. А название «Зиконотид» чаще используется для его активной субстанции – полученного с помощью пептидного синтеза ω-конотоксина.

Моллюски-конусы, а их известно более 300 видов, питаются небольшими рыбами, для охоты за ними они используют стилет, соединенный специальной протокой с их ядовитой железой. В этих железах моллюсков биосинтезируются многие сотни различных пептидных токсинов [46], которые, действуя на нервно-мышечную передачу в организме жертвы, обездвиживают последнюю.

После установления строения ряда токсинов из различных видов моллюсков-конусов было синтезировано несколько тысяч их аналогов. Однако фармакологические испытания показали, что наибольший интерес в качестве потенциального лекарственного средства представляет все же один из природных токсинов, а не их синтетические производные. Этот токсин получил название ω-конотоксина MVIIA. Он был впервые получен из тихоокеанского моллюска *Conus magnus* и является линейный

пептидом, состоящим из 25 а.о. Шесть остатков цистеина в этом соединении образуют три дисульфидных связи [47, 48]. Дисульфидные связи придают ω-конотоксину хорошо сформированную и однозначную пространственную структуру и способность специфично блокировать работу NVSC кальциевых каналов (электрозависимые каналы N-типа). В результате токсин ингибирует передачу болевого сигнала, действуя при этом очень эффективно

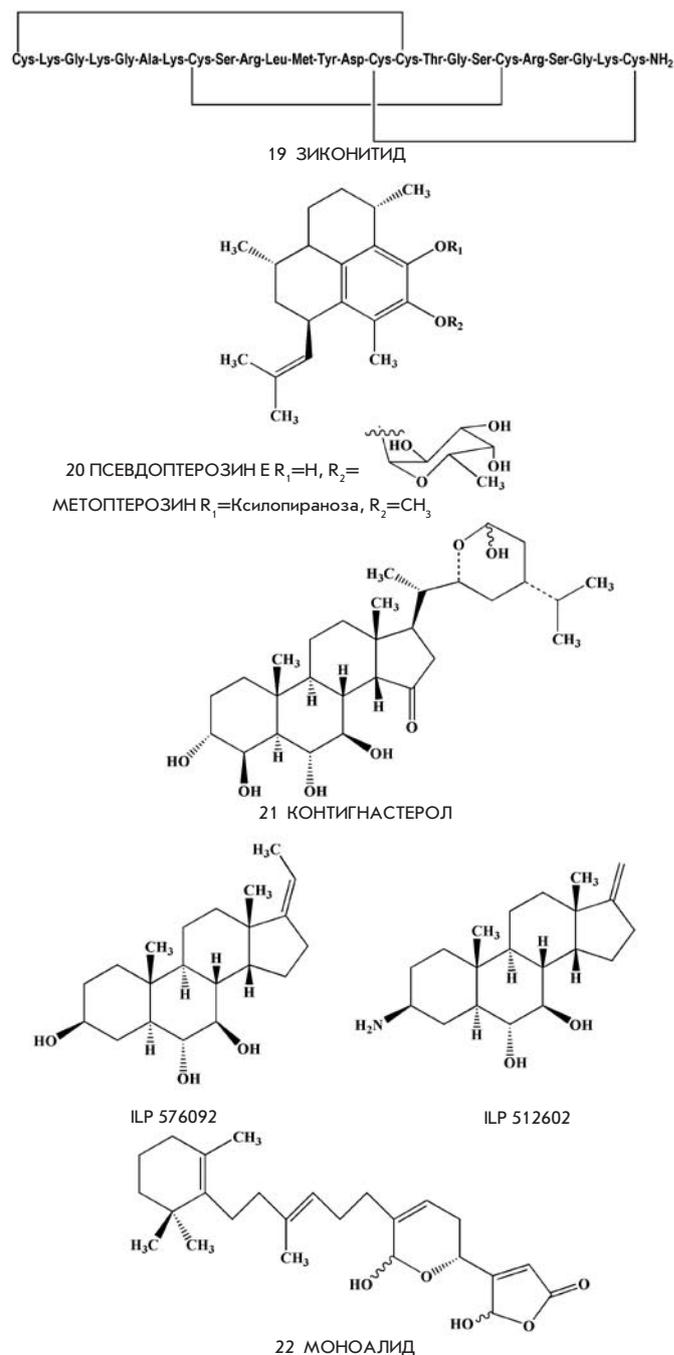


Рис. 5. Некоторые соединения, которые изучаются в качестве обезболивающих и противовоспалительных агентов

( $K_d = 9$  пМ). Клинические исследования синтетического  $\omega$ -конотоксина выполнялись фармацевтической компанией Neurex (филиал Elan Pharmaceuticals). Он оказался приблизительно в 1000 раз более мощным анальгетиком, чем морфин [49]. Эти исследования показали его высокую эффективность при тяжелых хронических болях, в т.ч. фантомных. «Зиконотид» (**19**) (рис. 5) в отличие от морфина, не обладает галлюциногенным эффектом и не вызывает привыкания [50].

Несколько других конотоксинов находятся сейчас на различных этапах исследований в качестве потенциальных лекарств. Клинические испытания некоторых соединений этого класса были прекращены из-за нежелательных побочных эффектов, например, препарата на основе пептида AM-336, который разрабатывался компанией AMRAD в качестве средства лечения хронических болей.

Недавно открытые группы конотоксинов, которые специфически блокируют  $\alpha 1$ -адренорецепторы, представляют собой прекрасные модельные соединения для создания на их основе новых обезболивающих медицинских препаратов [51].

### ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ И РАНОЗАЖИВЛЯЮЩИЕ МОРСКИЕ ПРИРОДНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

Сильным противовоспалительным действием обладают псевдоптерозины – группа дитерпеноидных гликозидов, выделенных Феникалом и сотрудниками из карибской горгонарии *Pseudopterogorgia elisabethae* в конце 80-х годов [52], например псевдоптерозин E (**20**) (рис. 5). По своему противовоспалительному действию эти вещества превосходят известное противовоспалительное лекарственное средство индометацин. Они влияют на биохимические трансформации арахидоновой кислоты, уменьшая синтез эйкозаноидов [53]. На основе частично очищенных экстрактов *P. elisabethae*, содержащих псевдоптерозин E, компанией Estee Lauder был создан косметический крем для кожи лица, который производится для коммерческой реализации. Для того чтобы обеспечить производство этого продукта необходимым количеством псевдоптерозинов, был осуществлен сбор большого количества горгонарий вдоль побережья Багамских островов и изучена регенерация этих кораллов после удаления части их колонии. С целью уменьшения ущерба для подводных биоценозов разрабатывались также два других подхода для наработки псевдоптерозинов: их агликоны были синтезированы несколькими способами [54–56] и затем гликозилированы, а кроме того, был найден биотехнологический путь их получения из фарнезилпирофосфата под действием ферментов, выделенных из *P. elisabethae* [57].

Синтетическое производное псевдоптерозинов, названное метоптерозином (OAS 1000), проходило клинические испытания в качестве противовоспалительного агента при лечении контактного дерматита, однако эти испытания не были завершены из-за банкротства компании OsteoArthritis Sciences Inc. [34]. Позднее это вещество находилось на стадии II клинических испытаний в качестве ранозаживляющего средства уже в компании Tyrosin Group Inc. (США).

Необычный стероид из губок *Petrosia contignata*, контигнастерол (**21**) (рис. 5) [58], под шифром IZP 94005 изучался в качестве противовоспалительного агента. Структурной

особенностью контигнастерола является cis-сочленение циклов C и D. В отличие от лекарственных средств аналогичного действия соединение (**21**) не является ингибитором фосфолипазы  $A_2$ , но ингибирует выделение гистамина лейкоцитами и относится к лейкоцит-селективным противовоспалительным агентам [59]. На основе этого вещества совместными усилиями Inflazyme Pharmaceutical Ltd. и Aventis Pharma (США) разрабатывалось новое лекарственное средство. Однако из-за слишком сложной структуры контигнастерол был модифицирован и заменен более простыми, но высокоактивными синтетическими аналогами IPL 576092 и IPL 512602 [60, 61].

Последнее соединение прошло две стадии клинического изучения при лечении астмы. После прекращения в 2004 году сотрудничества двух фирм Inflazyme продолжил дальнейшую работу самостоятельно: было получено еще несколько перспективных производных, а испытания включали уже не только астму, но и воспалительные заболевания кожи и глаз [34]. Однако после перепродажи этого проекта в 2008 году компании Orexo Pharmaceuticals сведения о его дальнейшем продвижении отсутствуют.

Еще один терпеноид, выделенный из губок, а именно моноалид (**22**) (рис. 6) из *Luffariella variabilis* [62], был получен Шоером и сотрудниками в 1980 году. Это вещество имеет две замаскированные альдегидные группы (полуацетальную и в виде  $\gamma$ -лактонного производного), которые реагируют с аминогруппами лизиновых остатков на поверхности центра связывания субстрата в фосфолипазе  $A_2$ . В результате соединение (**22**) специфически ингибирует этот фермент и препятствует гидролитическому отщеплению арахидоновой кислоты от фосфолипидов, проявляя противовоспалительные свойства. Сильное противовоспалительное действие моноалида [63, 64] привлекло внимание Allergen Pharmaceutical (США). Компания приобрела лицензию на препарат и выполнила две стадии клинического тестирования этого вещества в качестве средства лечения псориаза. Однако проблемы с низким транспортом активной субстанции через кожу пациентов вынудили остановить дальнейшие клинические исследования. В то же время моноалид выпускается в качестве биохимического реагента – специфического ингибитора фосфолипазы  $A_2$ . Кроме того, продолжают попытки получить с помощью органического синтеза такое производное моноалида, которое будет лишено его недостатков.

На основе комплекса коллагенолитических протеаз из гепатопанкреаса камчатского краба *Paralitodes chamschaticus* в Тихоокеанском институте биоорганической химии ДВО РАН (ТИБОХ) был создан новый лекарственный препарат «Коллагеназа КК», и, после выполнения комплекса доклинических и клинических исследований, он был разрешен к производству и применению в России. Препарат был рекомендован как средство ферментативного очищения ран при изъязвлениях и некрозах, включая ожоги, обморожения, гангрены, хронический остеомиелит, варикозные язвы и т.п. [65–67] Опыт клинического применения «Коллагеназы КК» после выпуска ее первой промышленной партии показал, что этот препарат, кроме указанных выше областей медицинского применения, может оказаться полезным при лечении некоторых других заболеваний и при послеоперацион-

ных осложнениях. Так, получены неплохие результаты при применении «Коллагеназы КК» в эндоскопической и пластической хирургии, при гнойном перитоните у детей, имеются данные о возможности с ее помощью выполнять разрушение коллагена спаек.

**МОРСКИЕ ПРИРОДНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ, ОБЛАДАЮЩИЕ АНТИВИРУСНЫМИ И ПРОТИВОМИКРОБНЫМИ СВОЙСТВАМИ**

После открытия в начале 50-х годов прошлого века арабинонуклеозидов, обладающих противовирусными и противоопухолевыми свойствами, и последующего синтеза ряда нуклеозидных производных, ставших биологически активными субстанциями антивирусных препаратов, поиск новых морских противовирусных соединений продолжается. Соединения с такой активностью были найдены среди терпеноидов, стероидов, алкалоидов, алифатических и ароматических производных, пептидов, полисахаридов и других вторичных метаболитов, выделенных из самых разнообразных морских организмов [68–71].

Из вирусных болезней СПИД остается одним из наиболее опасных и затрагивающих огромные массы людей. Число больных СПИДом приближается к 50 млн, и оно ежедневно увеличивается приблизительно на 16 тыс. человек. При тестировании против ВИЧ к началу 2003 года было найдено более 150 высокоактивных морских вторичных

метаболитов [69, 70]. Съедобные водорослевые полисахариды, в частности фукоиданы, каррагинаны и другие, препятствуют проникновению ВИЧ в мононуклеарные клетки человека. Некоторые из них ингибируют репликацию вируса в очень низких концентрациях (0.1–0.01 мкг/мл) и усиливают действие «Азидотимидина» на вирус. Однако ряд специалистов считают, что их антивирусные эффекты являются следствием неспецифического взаимодействия либо с вирусами, либо с клетками, а сами эти вещества плохо проникают в биологические жидкости [70]. Поэтому вопрос о том, можно ли эти вещества рассматривать как вспомогательные средства, имеющие определенные перспективы быть использованными при лечении больных СПИДом, остается пока нерешенным.

Пептиды из некоторых морских беспозвоночных являются еще одной перспективной группой антивирусных веществ. Например, состоящие из 17–18 а.о. пептиды из мексехвостов *Tachypleus tridentales* и *Limulus polyphemus* обладают сильным антивирусным эффектом против ВИЧ-1, а в ходе реализации проекта по созданию на их основе нового лекарственного средства были осуществлены синтезы аналогичных, но более простых по строению соединений. Одно из них (Т144) имело  $IC_{50} = 2.6$  нМ в отношении этого вируса при низкой цитотоксичности ( $IC_{50} = 44.6$  мкМ) [72, 73, 69]. Проект создания на его основе антивирусного препарата имеет хорошие шансы на успех.

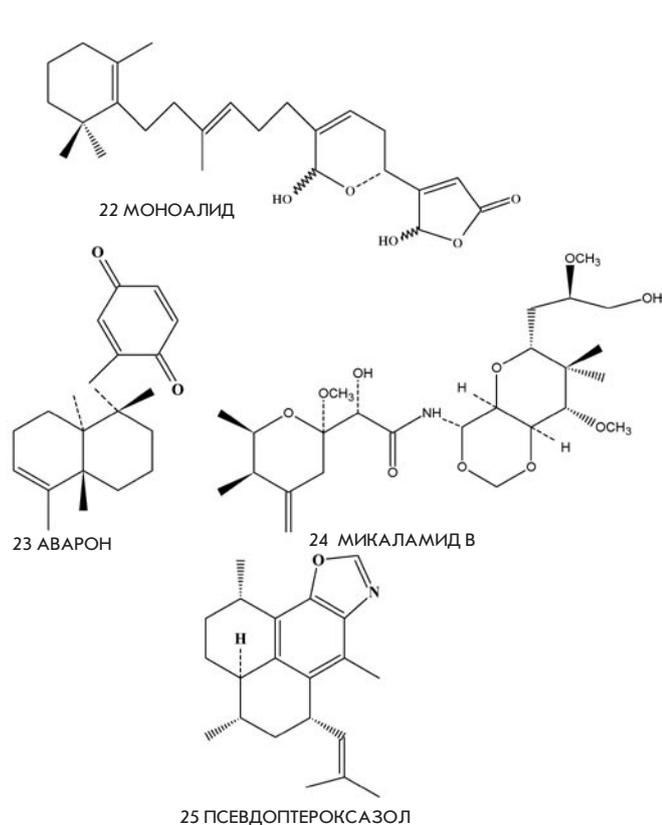


Рис. 6. Морские природные противовирусные соединения

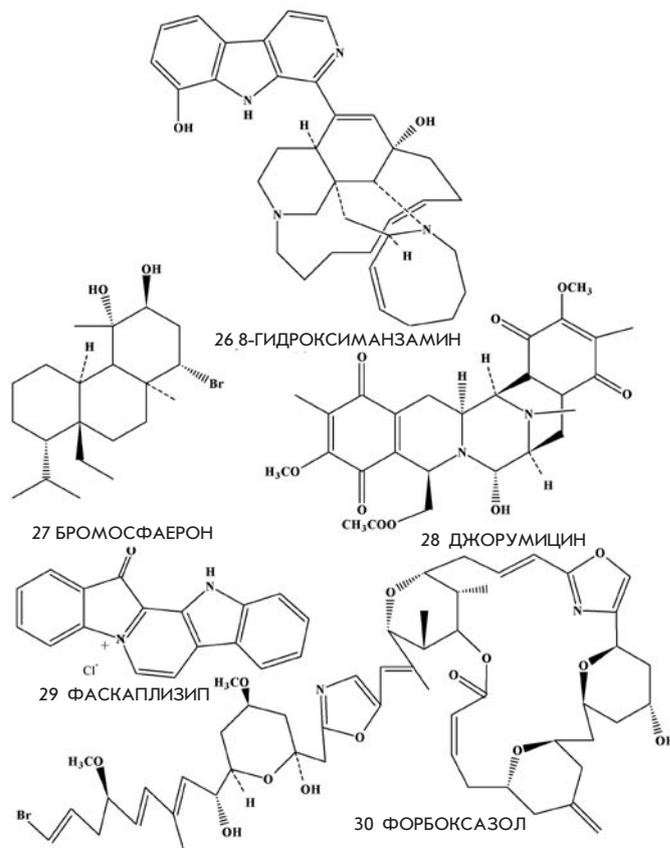


Рис. 7. Морские природные антиинфекционные агенты

Из высокоактивных низкомолекулярных противовирусных веществ морского происхождения следует также назвать уже упоминавшийся дидемнин В из асцидий, который в дозе 0.25 мкг/кг при ежедневном введении мышам, зараженным смертельной дозой вируса Rift Valley лихорадки, приводил к 90 %-ному выживанию животных. Некоторые надежды связывают со сравнительно простым терпеноидом авароном (23) (рис. 6) и близкими к нему соединениями из губок рода *Dysidea*, которые ингибируют обратную транскриптазу из ВИЧ-1 и сам вирус в концентрации 0.1 мкг/мл [70]. В качестве еще одного примера противовирусного метаболита губок можно привести микаламид В (24) (рис. 6) из новозеландской *Mycale* sp. Это вещество является мощным ингибитором синтеза белка, а при тестировании на различных вирусах *in vitro* показывало ингибирующую активность в дозе 2 нг/диск [70]. Создание лекарственных препаратов на основе этих и других высокоактивных соединений тормозится высокой токсичностью некоторых из них или малой доступностью. В то же время эти и другие высокоактивные вещества морского происхождения являются прекрасными моделями для синтезов новых менее токсичных, но высокоактивных противовирусных агентов.

Из многочисленных морских антимикробных соединений некоторые показали высокую активность против туберкулезной бактерии *Mycobacterium tuberculosis*. Например, псевдоптероксазол (25) (рис. 6), бензоксазолный дитерпеновый алкалоид из горгонарии *Pseudopterogorgia elisabethae*, ингибирует рост этой микобактерии на 97 % в концентрации 12.5 мкг/мл при отсутствии токсических эффектов [71], а (+)-8-гидроксиманзамин (26) (рис. 7) из губки *Pachypellina* sp [71] имеет минимальную ингибирующую концентрацию 0.91 мкг/мл. Манзамин еще более активен против простейшего *Taхoplasmа gondii* (IC<sub>50</sub> = 0.054 мкг/мл), инфекционного агента, который вызывает опаснейшее (в особенности для беременных женщин и детей) заболевание – токсоплазмоз. Использованию этого вещества в медицине мешает его малая доступность.

Высоко активны в отношении золотистого стафилококка *Staphylococcus aureus* дитерпеноид бромосфаерон (27) (рис. 7) из красной водоросли *Sphaerococcus coronopifolius* (IC<sub>50</sub> = 0.078 мкг/мл), димерный изохинолиновый алкалоид джорумидин (28) (рис. 7) из тихоокеанского голожаберного моллюска *Jorunna funebris* (IC<sub>50</sub> = 0.050 мкг/мл) и ряд других морских метаболитов [71].

Однако все эти вещества, как и проявляющие сильное противогрибковое действие алкалоиды фаскаплизин (29) (рис. 7), макролид форбоксазол А (30) (рис. 7) и другие [71] в своем большинстве оказались слишком токсичными, чтобы их можно было использовать при клиническом тестировании.

### МОРСКИЕ ПРИРОДНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ С ДРУГИМИ БИОЛОГИЧЕСКИМИ ЭФФЕКТАМИ

На основе пигментов морских ежей, обладающих антиоксидантными, противомикробными и противовоспалительными свойствами, в ТИБОХ были созданы и позднее разрешены к производству и применению в России два новых лекарственных препарата: «Гистохром для офтальмологии» и «Гистохром для кардиологии» [74]. Первый из них показал высокую эффективность при травмах и кровоиз-

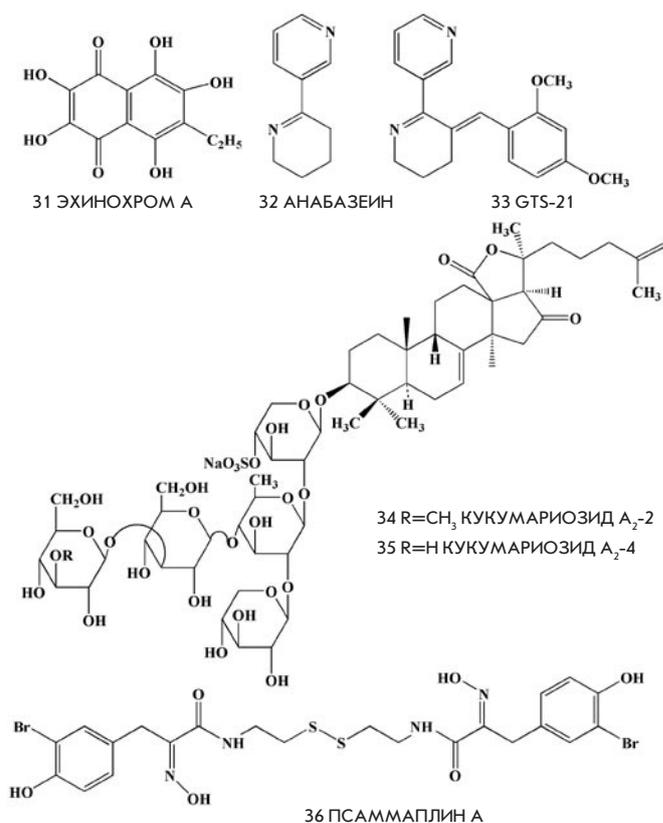


Рис. 8. Другие физиологически активные морские природные соединения

лияниям, вызванных различными причинами, и при ряде других заболеваний глаз, а второй является кардиопротектором, уменьшающим почти вдвое зону некроза при остром инфаркте миокарда. Обычно он назначается капельно за 10 мин до тромболитической терапии и уменьшает частоту экстрасистол. Кардиологический гистохром снижает также частоту осложнений при операциях на открытом сердце. Основной компонентом активной субстанции обеих лекарственных форм является известный пигмент эхинохром (31) (рис. 8). Был найден доступный природный источник эхинохрома (плоский морской еж *Scaphechinus mirabilis*), разработаны способы выделения, а затем и синтеза этого пигмента с высоким выходом [47].

Опыт клинического использования препаратов серии «Гистохром» показал их преимущества по сравнению с применяемыми ранее лекарствами аналогичного назначения. Особенно интересная информация накоплена для офтальмологического средства. Так, показано, что «Гистохром для офтальмологии» с успехом может использоваться для лечения гемофтальмов и различных глазных патологий детей, а также катаракты и при хирургических операциях на глазах.

В 1971 году было сообщено о выделении токсина (32) (рис. 8) из морского червя – голлонемертины, который позднее был назван анабазеином [75]. Синтез многочисленных аналогов этого вещества привел к нескольким высо-

коактивным соединениям, в т.ч. к препарату GTS-21 (33) (рис. 8), который проявляет цитопротекторные свойства и улучшает память у подопытных животных. Конкурентно с природными лигандами препарат связывается с  $\alpha 4\beta$  и  $\alpha 7$ -подтипами никотиновых рецепторов, причем последний считается важным в контроле  $\beta$ -амилоидной нейротоксичности. Японская компания Taicho приобрела у Университета штата Флорида лицензию на эти вещества и организовала их клинические исследования в Европе и США. Первые этапы клинического изучения показали значительные когнитивные эффекты GTS-21 на пациентах-добровольцах [76]. В настоящее время продолжается изучение препаратов этой серии в качестве потенциальных лекарственных препаратов для терапии болезни Альцгеймера.

Голотурии (морские огурцы), беспозвоночные, принадлежащие к классу Holothurioida типа Echinodermata (иглокожие), издавна привлекли внимание жителей восточноазиатских стран своими биологически активными веществами. Съедобным животным этого класса (трепангам) приписывают целебные свойства, включая стимулирующий, ранозаживляющий и другие полезные эффекты. Однако о веществах, ответственных за биологическую активность трепангов, до недавних пор ничего известно не было.

В результате многолетних исследований сотрудниками ТИБОХ были собраны в различных районах Мирового океана около 50 видов голотурий, а из их экстрактов выделены более 100 новых физиологически активных тритерпеновых гликозидов [67]. Некоторые из них оказались мощными модуляторами клеточного иммунитета. На основе таких веществ разрабатывается потенциальный лекарственный препарат, названный «Кумазидом», который содержит в качестве активной субстанции вещества (34, 35) (рис. 8) [77]. Препарат в очень низких дозах увеличивает резистентность подопытных животных к бактериальным инфекциям, радиации, стимулирует фагоцитарную и бактерицидную активность макрофагов, тормозит опухолевый рост и усиливает действие известных противоопухолевых лекарств, не проявляя при этом токсических свойств [78, 79]. В ближайшее время будут начаты его клинические испытания.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разнообразие морских природных соединений достаточно высоко. Причем каждый год число известных морских природных соединений увеличивается (в 2007–2008 годах приблизительно на 1000 соединений в год) [80]. Биохимическое разнообразие является следствием высокого биологического разнообразия в морях и океанах. По прогнозным оценкам на нашей планете живет несколько миллионов видов морских микроорганизмов, около миллиона еще не описанных видов морских беспозвоночных и других морских организмов.

Изучение морских природных соединений уже привело к созданию ряда высокоэффективных лекарственных средств, включая противоопухолевые и противовирусные препараты («Арабиноцитидин», «Арабиноаденозин», «Трабектидин»), обезболивающее средство «Приалт», два отечественных лекарственных препарата серии «Гистохром», обладающие способностью уменьшать зону некроза после инфаркта миокарда и лечить последствия кровоизлияний в глаз различной этиологии соответственно, а также оте-

чественное противоопухолевое средство «Коллагеназа КК». Более 40 противоопухолевых, противовоспалительных, иммуностимулирующих и других кандидатов в лекарства (т.н. «pharmaceutical leads») находятся на разных этапах доклинического и клинического тестирования. Это стало возможным благодаря высокой физиологической активности ряда морских природных соединений. Действительно, среди них имеются самые мощные небелковые токсины (палитоксин, маитотоксин), самые эффективные ингибиторы развития опухолевых клеток (спонгистатин и др.), самые сильные обезболивающие соединения (токсины моллюсков-конусов) и другие экстремально активные соединения.

По-видимому, многие морские вторичные метаболиты, выделенные из губок, асцидий и других морских беспозвоночных, биосинтезируются симбионтными микроорганизмами [80]. Только около 1 % таких микроорганизмов растут на искусственных средах и могут быть культивированы. В качестве примера можно привести сообщение американских ученых о выделении бактерии *Micromonospora* sp из глубоководной морской губки. Она продуцирует манзамин и 8-гидроксиманзамин. Как уже указывалось, эти вещества показывают очень перспективную противопаразитарную и противотуберкулезную активности, но не могли быть получены в больших количествах из губок. Интересно, что биосинтез физиологически активных алкалоидов в этой бактерии идет только на специально подобранной среде, а при стандартном культивировании они не образуются [5]. В последнее время Феникалом и сотрудниками осуществляется подбор сред для культивирования морских микроорганизмов с учетом условий, существующих в местах их обитания. В результате им удалось культивировать целый ряд морских актиномицетов и получить из них серию новых вторичных метаболитов [81]. Они показали на примере изучения родственных видов, относящихся к новому роду *Salinispora*, что биосинтез вторичных метаболитов в морских микроорганизмах часто является не штамм-специфичным, а видоспецифичным, что делает такие микроорганизмы удобным и воспроизводимым источником высокоактивных соединений. По мнению Ньюмана и других сотрудников Национального института рака (США) «изучение биоактивных веществ из морских микроорганизмов сейчас только начинается» [81].

В последние годы возникло новое направление поиска и изучения морских природных соединений – морская метагеномика. В рамках этого направления анализируются и становятся предметом манипуляций не отдельные геномы, а совокупность геномов из какого-то места обитания, например губок. Кроме собственного губочного генома, здесь могут быть найдены геномы многочисленных микроорганизмов, в подавляющем большинстве некультурабельных. Перенос больших кластеров генов в бактерии, которые легко культивируются, с последующим анализом продукции метаболитов в отдельных клонах может привести к получению продуцентов ценных соединений [82, 83]. Однако для решения проблемы получения ценных природных соединений этим методом необходимы знания о биосинтезе этих веществ. Недавно сообщалось о расшифровке генов, ответственных за биосинтез таких высокоактивных морских метаболитов, как бриостатины и некоторые метаболиты, выделенные из губок [83, 84]. Метагеномные проекты

осуществляются сейчас для целых акваторий (бухта Монтерей, Саргассово море и т.п.) [85].

Некоторые морские организмы обладают высокой продуктивностью. Например, продуктивность микроводорослей выше, чем сельскохозяйственных растений. Они могут быть источниками не только таких ценных для медицины веществ, как  $\omega$ -3 жирные кислоты и каротиноиды, но, вероятно, и других высокоактивных соединений, а также биотоплива. Необходимы отбор наиболее перспективных штаммов этих растений и разработка фотобиореакторов нового поколения для решения проблем получения биомассы в достаточных для решения этих задач количествах [86].

Наконец, изучение биологически активных морских природных соединений стимулирует работы по органическому

синтезу самих этих соединений, а также их производных и аналогов. В результате создаются большие библиотеки соединений, в т.ч. имеющих более высокую активность, чем вещество-прототип. Например, при работе с ингибиторами гистондеацетилазы компания Novartis в сотрудничестве с группой известного химика-синтетика Николая, используя в качестве прототипа морское природное соединение псаммаплин А (**36**) (рис. 8), получила методами органического синтеза библиотеку из 3828 веществ, причем 6 из них были высоко активны к метициллин- и ванкомицинустойчивым штаммам *Staphylococcus aureus* [5]. ●

*Автор благодарит за частичную поддержку данной работы Программу Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и Грант НШ 2813.2008.4.*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Семенов А.А. Очерк химии природных соединений // Отв. ред. Толстикова Г.А., Новосибирск, Наука. 2000. 664 с.
- Bergmann W., Feeney R.J. // *J. Org. Chem.* 1951. 16. 981–987.
- Bergmann W., Burke D.C. // *J. Org. Chem.* 1956. 21. 226–228.
- Bergmann W., Stempin M.F. // *J. Org. Chem.* 1957. 22. 1575–1577.
- Newman D.J., Cragg G.M. // *J. Nat. Prod.* 2004. 67. 1216–1258.
- Newman D.J., Cragg G.M. // *J. Nat. Prod.* 2007. 70. 461–477.
- Rinehardt K.L. et al. // *J. Org. Chem.* 1990. 55. 4512–4515.
- Wright A.E. et al. // *J. Org. Chem.* 1990. 55. 4508–4512.
- Corey E.J., Gin D.Y., Kania R.S. // *J. Am. Chem. Soc.* 1996. 118. 9202–9203.
- Cuevas C., Pérez M., Martín M.J. et al // *Org. Lett.* 2000. 2. 993–996.
- Pommier Y., Kohlhagen G., Bailly C., et al. // *Biochemistry.* 1996. 35. 13303–13309.
- Haefner B. // *Drug Discovery To-Day.* 2003. 8. 536–544.
- Molinski T.F., Dalisay D.S., Lieve S.L., Saludes J.P. // *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2009. 8. 69–85.
- Pettit G.R. et al. // *J. Am. Chem. Soc.* 1987. 109. 6883–6885.
- Pettit G.R. et al. // *J. Am. Chem. Soc.* 1989. 111. 5463–5465.
- Schöffski P., Thate B., Beutel G. et al. // *Ann. Oncol.* 2004. 15. 671–679.
- Talpir R., Benayahu Y., Kashman Y., Panell L., Schleyer M. // *Tetrahedron Lett.* 1994. 35. 4453–4456.
- Niu C., Smith D., Zask A. et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004. 14. 4329–4332.
- Hadaschik B.A., Ettinger S., Sowers R.D. et al // *Int. J. Cancer.* 2008. 122. 2368–2376.
- Gunasekera S.P., Gunasekera M., Longley R.E., Schulte G.K. // *J. Org. Chem.* 1990. 55. 4912–4915.
- Harried S.S., Lee C.P., Yang G., Lee T.I., Myles D.C. // *J. Org. Chem.* 2003. 68. 6646–6660.
- Hung D.I., Nerenberg J.B., Schreiber S.I. // *J. Am. Chem. Soc.* 1993. 115. 12621–12622.
- Trimurtulu G. et al. // *J. Am. Chem. Soc.* 1994. 116. 4729–4737.
- Barow R.A. et al. // *J. Am. Chem. Soc.* 1995. 117. 2479–2490.
- Rinehart K.L., Gloer J.B., Cook J.C., Mizsac S.A., Scahill T.A. // *J. Am. Chem. Soc.* 1981. 103. 1857–1859.
- Gajate C., An F., Mollinedo F. // *Clin. Cancer Res.* 2003. 9. 1535–1545.
- Hirata Y., Uemura D. // *Pure Appl. Chem.* 1986. 58. 701–710.
- Aicher T.D. et al. // *J. Am. Chem. Soc.* 1992. 114. 3162–3164.
- Munro M.H., Blunt J.W., Dumdei E.J. et al. // *J. Biotechnol.* 1990. 70. 15–25.
- Moore K.S., Wehrli S., Roder H. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1993. 90. 1354–1358.
- Wehrli S.L., Moore K.C., Roder H., Durell S., Zasloff M. // *Steroids.* 1993. 58. 370–378.
- Sills A.K. Jr, Williams J.I., Tyler B.M. et al. // *Cancer. Res.* 1998. 58. 2784–2792.
- Ciulla T.A., Criswell M.H., Danis R.P., Williams J.I., McLane M.P., Holroyd K.J. // *Retina.* 2003. 23. 808–814.
- Gross H., König G.H. // *Phytochem. Rev.* 2006. 5. 115–141.
- Homann M.T., Scheuer P.J. // *J. Am. Chem. Soc.* 1993. 115. 5825–5826.
- Lopez-Macia A., Jimenez J.C., Royo M., Giraet E., Albericio F. // *J. Am. Chem. Soc.* 2001. 123. 11398–11401.
- Suárez Y., González L., Cuadrado A., Berciano M., Lafarga M., Muñoz A. // *Mol. Cancer Ther.* 2003. 2. 863–872.
- Feling R.H., Buchanan G.O., Mincer T.J. et al. // *Angew. Chem. Intl. Ed.* 2003. 42. 355–357.
- Chauhan D.L. et al. // *Cancer Cell.* 2005. 8. 407–419.
- Newman D.J., Cragg G.M., Snader K.M. // *J. Nat. Prod.* 2003. 66. 1022–1037.
- Radchenko O.S. et al. // *Tetrahedron Lett.* 1997. 38. 3581–3584.
- Makarieva T.N., Stonik V.A., Dmitrenko A.S., Grebnev B.B. et al. // *J. Nat. Prod.* 1995. 58. 254–258.
- Lee A.H., Chen J., Liu D., Leung T.Y., Chan A.S., Li T. // *C. J. Am. Chem. Soc.* 2002. 124. 13972–13973.
- Fedorov S.N., Bode A.M., Stonik V.A. et al. // *Pharm. Research.* 2004. 21. 2307–2319.
- Волчо К.П. Использование природных соединений в каталитическом синтезе хиральных биологически активных веществ. Автореф. дис. на соискание ученой степени доктора химических наук. Уфа, 2009.
- Olivera B.M., Gray W.R., Zeikus R. et al. // *Science.* 1985. 230. 1338–1343.
- Olivera B.M., Miljanich G.P., Ramachandran J., Adams M.E. // *Ann. Rev. Biochem.* 1994. 63. 823–867.
- Chung D., Guar S., Bell J.R., Ramachandran J., Nadasci L. // *Int. J. Pept. Protein Res.* 1995. 46. 320–325.
- Wang Y.X., Pettus M., Gao D., Phillips C., Bowersox S. // *Pain.* 2000. 84. 151–158.
- Miljanich G.P. // *Curr. Med. Chem.* 2004. 11. 3029–3040.
- Harvey A.L. // *Trend Pharmacol. Sci.* 2002. 5. 201–203.
- Roussis V., Wu Z., Fenical W., Strobel S.A., Van Duyne G.D., Clardy J. // *J. Org. Chem.* 1990. 55. 4916–4922.
- Potts B.C.M., Faulkner D.J., Jacobs R.C. // *J. Nat. Prod.* 1992. 55. 1701–1717.
- Laserwith S.E., Johnson T.W., Corey E.J. // *Org. Lett.* 2000. 2. 2389–2392.
- Chow R. et al. // *J. Chem. Soc. Perkin Trans I.* 2001. 19. 2344–2355.
- Kocienski P.J., Pontiroli A., Qun L. // *J. Chem. Soc. Perkin Trans I.* 2001. 19. 2356–2366.
- Kohl A.C., Kerr R.G. // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2003. 30. 495–499.
- Burgoyne D.L., Andersen R.J., Allen T.M. // *J. Org. Chem.* 1992. 57. 525–528.
- Takei M., Burgoyne D.L., Andersen R.J. // *J. Pharm. Sci.* 1994. 83. 1234–1235.
- Kasserra V., Harris P., Stenton G.R., Abraham W., Langlands J.M. // *Pulm. Pharmacol. Ther.* 2004. 17. 309–318.
- Shen Y., Burgoyne D.L. // *J. Org. Chem.* 2002. 67. 3908–3910.
- De Silva E.D., Scheuer P.J. // *Tetrahedron Lett.* 1980. 21. 1611–1614.
- Jacobs R.S., Culver P., Langdon R., O'Brien T., White S.J. // *Tetrahedron.* 1985. 41. 981–984.
- Soriente A., De Rosa M.M., Scettri A. et al // *Curr. Med. Chem.* 1999. 6. 415–431.
- Козловская Э.П. и др. Ранозаживляющий препарат «Коллагеназа КК» широкого спектра действия. Патент РФ. 2093166 // *Бюл. изобр.* 1997. 29. 5.
- Stonik V.A., Mikhailov V.V., Bulgakov V.P., Zhuravlev Yu.N. // *Biotechnol. J.* 2007. 2. 818–825.
- Еляков Г.Б., Стоник В.А. // *Изв. Акад. наук. Сер. химическая.* 2003. № 1. 1–18.
- Mayer A.M.S., Rodriguez A.D., Berlinck R.G.S., Hamann M.T. // *Comp. Biochem. Physiol. Part C.* 2007. 145. 553–581.
- Gustafson K.R., Oku N., Milanowski D.J. // *Curr. Med. Chem. – Anti-Infective Agents.* 2004. 3. 233–249.
- Tzivelka L.-A., Vagias C., Roussis V. // *Curr. Topics in Med. Chem.* 2003. 3. 1512–1535.
- Donia M., Hamann M.T. // *Lancet Infect Dis.* 2003. 3. 338–348.
- Morimoto M. et al. // *Chemotherapy.* 1991. 37. 206–211
- De Clercq E. // *Med. Res. Revs.* 2000. 20. 323–349
- Мищенко Н.П., Федореев С.А., Багирова В.Л. // *Хим. фарм. журн.* 2003. № 37. 49–53.
- Kem W.R. et al. // *Mar. Drugs.* 2006. 4. 255–273.
- Martinez A. // *Canc. Opin. Inv. Drugs.* 2007. 8. 525–530.
- Aminin D.L. et al. // *Intern. Immunology.* 2006. 6. 1070–1082.
- Белоусов М.В. и др. // *Бюл. Сиб. Мед.* 2008. № 2. 20–22.
- Белоусов М.В. и др. // *Бюл. Сиб. Мед.* 2008. № 3. 9–12.
- Blunt J.W., Copp B.R., Hu W.P. et al. // *Nat. Prod. Rep.* 2009. 26. 170–244.
- Newman D.J., Hill R.T. // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2006. 33. 539–544.
- Piel J., Butzke D., Fusetani N. et al. // *J. Nat. Prod.* 2005. 68. 472–479.
- Schirmer A., Gadkari R., Reeves C.D. et al. // 2005. 71. 4840–4849.
- Hildebrand M., Waggoner L.E., Liu H. et al. // *Chem. Biol.* 2004. 11. 1543–1552.
- Piel J., Hui D., Wen G. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 2004. 101. 16222–16227.
- Venter J.C., Remington K., Heidelberg J.F. et al. // *Science.* 2004. 304. 66–74.
- Wijffels R.H. // *Trends in Biotechnology.* 2007. 26. 26–31.

УДК 578.232.4; 578.346; 578.323

# Нейраминидаза вируса гриппа: структура и функция

Ю.А. Штыря, Л.В. Мочалова, Н.В. Бовин\*

Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

\*E-mail: professorbovin@yandex.ru

**РЕФЕРАТ** Рассмотрена структура нейраминидазы вируса гриппа, организация активного центра этого фермента, обсуждается механизм десалилирования углеводных цепей нейраминидазой, а также ее роль в функционировании вируса гриппа на различных стадиях инфекционного цикла. Обобщены данные по субстратной специфичности нейраминидазы и рассмотрены подходы к изучению активности данного фермента. Приведены данные по лекарствам против гриппа – ингибиторам нейраминидазы; рассмотрен механизм приобретения устойчивости современных вирусов к одному из этих лекарств.

**Ключевые слова:** вирус гриппа, нейраминидаза, субстратная специфичность.

**Список сокращений:** HA – гемагглютинин; NA – нейраминидаза; Neu5Ac – N-ацетилнейраминовая кислота; 3'SiaLac – Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4Glc; 6'SiaLac – Neu5Ac $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 1-4Glc; MU-NANA – метилубеллиферил- $\alpha$ -нейраминовая кислота; BODIPY – 6-((4,4-дифторо-5,7-диметил-4-бора-3а,4а-диазо-8-индацин-3-пропионил)амино)-гексановая кислота, сукцинимидный эфир; MDCK – линия клеток почки собаки; VERO – линия клеток почки африканской зеленой марьшски; Neu5Gc – N-гликолилнейраминовая кислота; 3'SiaLacNAc – Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc; 6'SiaLacNAc – Neu5Ac $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 1-4GlcNAc.

## ВВЕДЕНИЕ

Вирус гриппа представляет собой (-)РНК-содержащий оболочечный вирус с сегментированным геномом, генетический материал вируса гриппа закодирован в восьми сегментах РНК. Все сегменты РНК упакованы в белок нуклеокапсида, и к каждому из сегментов присоединяется комплекс полимеразных белков. В таком виде сегменты упаковываются в липопротеидную оболочку, выстланную изнутри матриксным белком, на внешней поверхности которой экспонированы гемагглютинин, нейраминидаза и М2 белок.

Нейраминидаза – это экзосиалидаза (ЕС 3.2.1.18), расщепляющая  $\alpha$ -кетозидную связь между терминальным остатком сиаловой (N-ацетилнейраминовой) кислоты и следующим моносахаридным остатком [1]. Аминокислотная последовательность NA закодирована в шестом сегменте РНК. У вирусов гриппа А насчитывается девять подтипов NA, у вирусов В и С – только по одному [2]. Девять подтипов нейраминидазы вируса гриппа А разделяют на две филогенетические группы. В первую входят нейраминидазы подтипов N1, N4, N5 и N8, а во вторую – N2, N3, N6 N7 и N9 [3].

Фермент вируса гриппа С не относится к нейраминидазам, его функция состоит в O-деацетилировании N-ацетил-9-O-ацетилнейраминовой кислоты, т.е. он является эстеразой, поэтому не будет рассматриваться в обзоре.

NA вируса гриппа выполняет несколько функций. Во-первых, ее активность необходима на стадии отпочковывания созревших вирусных частиц от зараженной клетки, для предотвращения агрегации вирусных частиц; кроме того, NA отщепляет остатки нейраминовой кислоты муцинов респираторного тракта, тем самым облегчая движение вируса к клетке-мишени. Подробнее эти функции будут рассмотрены далее.

## СТРУКТУРА НЕЙРАМИНИДАЗ

Полипептидная цепь NA вируса гриппа состоит из 470 аминокислотных остатков. В третичной структуре NA можно выделить несколько структурно-функциональных доменов: цитоплазматический, трансмембранный, «голову», а также «стебель», соединяющий голову фермента с трансмембранным доменом.

На поверхности вириона NA представляет собой гомотемер, имеющий грибообразную форму: голова размером 80-80-40 Å на тонком стебле диаметром 15 Å и длиной от 60 до 100 Å [2]. Молекулярный вес мономера  $\approx$ 60 кДа, а тетрамера  $\approx$ 240 кДа [1]. Одна вирусная частица несет в среднем 50 тетрамеров. Тетрамеры могут собираться в кластеры на поверхности вириона [4]. Известна пространственная структура нейраминидаз N1, N2, N4, N8, N9 и В [1, 3, 5, 6, 7]. Несмотря на то что гомология NA типов А и В составляет всего лишь 30 %, их пространственные структуры практически идентичны [6].

## ГОЛОВА ФЕРМЕНТА

В голове NA расположен активный центр, а также кальций-связывающий домен, который стабилизирует структуру фермента при низких значениях pH [2, 8].

Гомология между штаммами внутри подтипа достигает 90 %, в то время как между подтипами – 50 %, а между типами А и В – 30 % [9]. Особой консервативностью отличается район а.о. 74–390 (нумерация по N2)<sup>1</sup>. Остатки, непосредственно участвующие в каталитической активности фермента (Arg118, Asp151, Arg152, Arg224, Glu276, Arg292, Arg371 и Tyr406, рис. 1), инвариантны среди всех подтипов NA, а также типа В. Это справедливо и для аминокислот, формирующих пространственную структуру активного центра: Glu119, Arg156, Trp178, Ser179, Asp198, Ile222, Glu227, Glu277, Asp293, и Glu425. Особо консервативными являются остатки аспарагина, формирующие сайт гликозилирования (в частности, Asn146), а также пролина и цистеина, которые обеспечивают необходимую укладку полипептидной цепи, стабилизируя третичную структуру молекулы [2].

Сайт связывания кальция, расположенный в глубине головы (практически «под» активным центром, если располагать его так, как изображено на рисунке), сформирован кислородами главной цепи остатков 297, 345 и 348, а также кислородом боковой цепи остатка Asp324 [1, 6]. Кроме них, в формировании сайта участвуют а.о. 293, 347, 111–115 и 139–143 [8].

У нейраминидазы N9 был найден второй сайт связывания нейраминавой кислоты, т.н. НВ-сайт [10]. Последовательность а.о., соответствующая этому сайту, высоко консервативна у птичьих вирусов. Этот участок формируется тремя петлями NA:

- 367–372, которая вовлечена в связывание нейраминавой кислоты через сериновые остатки 367, 370 и 372;
- 400–403, которая взаимодействует с субстратом через боковую цепь аспарагина 400, карбонильный кислород основной цепи аспарагина, и триптофан 403;
- 430–433, взаимодействует с субстратом через ε-аминогруппу лизина 432.

Все шесть отмеченных выше консервативных остатков найдены только у нейраминидазы N9. У NA вирусов птиц других подтипов обычно отсутствует лизин 432, но это не отражается на их гемоадсорбционной активности. Типичная последовательность а.о. НВ-сайта обычно не обнаруживается у вирусов гриппа человека. В то же время у двух ранних человеческих изолятов подтипа H2N2 (RI+/57 и А/Ленинград/134/57) обнаружен «контур» НВ-сайта (триада серинов и триптофан) [10, 11] – это может свидетельствовать о том, что при адаптации вируса гриппа к размножению в организме человека происходит элиминация данного сайта.

Функция НВ-сайта пока не ясна. Предполагается, что он может играть роль альтернативного сайта связывания нейраминавой кислоты, т.е. функционировать как суррогат НА вируса гриппа; такое предположение отталкива-

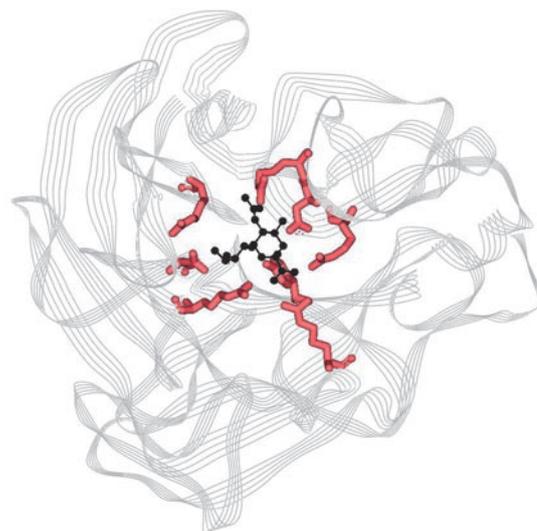


Рис. 1. Активный центр нейраминидазы вируса гриппа А (подтипа N2) в комплексе с Neu5Ac2en (2-дезоксиде-2,3-дидегидро-N-ацетилнейраминавой кислотой). Neu5Ac2en обозначена черным, функциональные а.о. активного центра – красным

ется от факта существования вирусов, у которых функции NA и HA совмещены в одном белке, как, например, в ND вирусе. Описанный НВ-сайт характерен для NA тех вирусов, гемагглютинин которых взаимодействует с α2-3-сиалилированными углеводными цепями (т.е. вирусов гриппа птиц и лошадей), в то время как у вирусов с α2-6-специфичностью (человеческих, свиных, и H9N2 вирусов домашней птицы) этот сайт изменен по ключевым аминокислотным позициям. Интересно, что вирусы H9N2, выделенные из домашней птицы в Гонконге, и вирусы подтипов H2N2 и H3N2, вызывавшие пандемии у человека, имеют сходные замены в НВ-сайте. Эти данные позволяют предположить, что некоторые виды домашней птицы могут служить промежуточными хозяевами при переносе вирусов гриппа из их естественного резервуара (в популяции водоплавающих птиц) к человеку [11].

## ПРОСТРАНСТВЕННАЯ УКЛАДКА

Пространственная структура цитоплазматического и трансмембранного доменов, а также стебля NA пока не решена (в связи с особенностями ферментативного отщепления этого мембранного белка от вириона кристаллизуемый продукт начинается с остатков ~74–77) [6]. Существует гипотеза об α-спиральной укладке участка полипептидной цепи, не вошедшего в состав кристаллизуемого продукта, частично подтвержденная при помощи криоэлектронной микроскопии [4]. Поэтому с определенностью можно говорить об укладке полипептидной цепи только в районе головы (в составе тетрамера). Голова представляет собой большой домен, состоящий из шести идентичных антипараллельных β-слоев (мотивов), организованных в пропеллер-подобную структуру. Наиболее важными для функционирования фермента являются петли между

<sup>1</sup> Так как аминокислотные последовательности различных нейраминидаз отличаются друг от друга вставками и делециями, то принято указывать подтип NA, на основании которого приведены номера аминокислотных остатков, обычно, как и в данном случае, подтип N2.

этими мотивами, а также между вторым и третьим тяжами каждого мотива [2]. Петли являются наиболее вариабельной частью структуры всех NA, варьируя по длине и даже неся элементы упорядоченности, типичные для вторичной структуры. В петлях N9, например, найдены  $\alpha$ -спиральные участки: остатки 106–110 формируют один виток ( $\alpha$ ), лежащий над С-концом полипептидной цепи, образующим, в свою очередь, тоже один виток  $\alpha$ -спирали наряду с а.о. 144–146 соседней субъединицы ( $3_{10}$ ). Спираль  $3_{10}$  образует с двумя цепями (106–110 и С-концевой) антипараллельный слой [6]. Петля, соединяющая четвертый и пятый мотивы, является самой длинной, она стабилизирована дисульфидным мостиком между Cys318 и Cys337, содержит консервативную ионную пару Asp330-Arg364 и сайт связывания иона  $Ca^{2+}$  [1].

### ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕ

Углеводные цепи прикреплены к остаткам Asn, находящимся на разных участках поверхности головы NA, а именно: гликаны, присоединенные к аспарагинам 86 и 234, ориентированы в сторону липидной мембраны, ближе к стеблю, а к Asn146 – в сторону от липидной мембраны, вблизи активного центра; наконец, сайт Asn200 расположен на боковой поверхности, соединяющей субъединицы. При Asn86 и Asn200 обнаружены короткие цепи олигоманнозного типа. Углеводные цепи при Asn146 и Asn234 относятся к комплексному типу. Сайт гликозилирования по Asn146 является консервативным для всех NA, а углеводная цепь в этой позиции отличается по структуре от всех, обнаруженных в составе гликопротеинов вирусов гриппа, а именно содержит сульфатированный по О-4 N-ацетилгалактозамин [1]. Гликозилирование Asn146, по-видимому, играет регуляторную функцию; известно, что его отсутствие обуславливает нейровирулентность вируса гриппа A/WSN/33 (H1N1). Показано, что углеводная цепь при Asn146 влияет на ферментативную активность NA, снижая ее в 20 раз [12]. Удаление сайта гликозилирования 144 нейраминидазы подтипа N8 (А/утка/Украина/1/63) приводит к изменению профиля субстратной специфичности NA [13], а отсутствие сайтов гликозилирования по 83 и 398 а.о. приводит к неправильному фолдингу.

### ДИСУЛЬФИДНЫЕ СВЯЗИ

В NA найдено восемь консервативных дисульфидных мостиков, а также один дополнительный – в подтипах N2, N8, и N9. Инвариантность дисульфидных связей подтверждает их важность для формирования стабильной структуры NA. Предполагается, что благодаря близости к оси симметрии тетрамера неспаренный Cys161 в NA (N1) участвует в соединении двух субъединиц. Механизм сборки тетрамера не универсален, так, в нейраминидазах вируса гриппа В связи между субъединицами образуются за счет Cys54, в то время как Cys78 участвует в связывании пар полипептидных цепей (здесь нумерация по N2), [2].

### СТРОЕНИЕ АКТИВНОГО ЦЕНТРА

Сайт связывания Neu5Ac расположен «над» первыми тяжами третьего и четвертого мотивов, в большом кармане на поверхности NA. Активный центр находится на N-конце центральных параллельных тяжей [2] (рис. 1). Он представ-

ляет собой кратер диаметром 16 Å и глубиной от 8 до 10 Å, расположенный на расстоянии 32 Å от оси симметрии четвертого порядка. Сайт фланкирован двенадцатью гибкими петлями, которые тянутся вверх и наружу от этой оси [6].

Активный центр фермента сформирован функциональными остатками Arg118, Asp151, Arg152, Arg224, Glu276, Arg292, Arg371 и Tyr406, а также структурными остатками Glu119, Arg156, Trp178, Ser179, Asp (или Asn у N7 и N9) 198, Ile222, Glu227, Glu277, Asp293 и Glu425.

Функциональные а.о. контактируют непосредственно с продуктом ферментативной реакции – сиаловой кислотой, а все образуемые ими контакты полярны, за исключением Arg224, в котором алифатическая часть образует неполярный контакт с глицериновым фрагментом остатка Neu5Ac [9] (рис. 1).

Недавние результаты рентгеноструктурных исследований нейраминидаз, относящихся к первой филогенетической группе, показали, что, по сравнению с нейраминидазами, относящимися ко второй филогенетической группе, они обладают несколько другим строением полипептидной цепи, которая окружает активный центр фермента. В частности, вблизи активного центра расположена полость, которая сформирована изменением пространственной ориентации «петли 150». Данные пространственные различия позволяют начать разработку ингибиторов NA вируса гриппа, специфично взаимодействующих только с NA, относящихся к первой филогенетической группе, в частности к NA H5N1 вирусов гриппа [3].

### МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ НЕЙРАМИНИДАЗЫ

Механизм действия NA (схема 1) был предложен на основании рентгеноструктурных данных исследования кристаллического белка [7].

Формирование оксокарбониевого иона при атоме C2 молекулы Neu5Ac является ключевым шагом в гидролизе олигосахарида-субстрата. После попадания остатка Neu5Ac в активный центр, из-за сильных ионных взаимодействий между карбоксилатом субстрата и гуанидиновыми группами аргининов 118, 292 и 371 остаток Neu5Ac переходит из конформации кресла в конформацию полукресла, т.е. образуется оксокарбониевый ион, что в конце концов приводит к расщеплению гликозидной связи. Агликон уходит из активного центра фермента с гликозидным кислородом, протонированным растворителем. Многочисленные контакты между интермедиатом и а.о. активного центра (наиболее важны Tyr406 и Asp151) стабилизируют положительно заряженный оксокарбониевый ион с сохранением планарного углерода при C2. Интермедиат в планарной конформации похож на Neu5Ac2en [6], в котором C2 находится в  $sp^2$ -состоянии. На этой стадии реакции остаток нейраминовой кислоты ковалентно связан с гидроксильной группой Tyr406 белка, что характерно для всех экзосиалидаз [15, 17]. Лимитирующей стадией ферментативного процесса является гидроксильное оксокарбониевое иона растворителем с уходом продукта реакции в виде Neu5Ac из активного центра фермента. Следует отметить, что существенных изменений в координатах активного центра NA по ходу реакции не происходит [18].

Наличие инвариантных остатков в составе активного центра, сходство пространственной организации, а также

архитектура комплексов с Neu5Ac и с Neu5Ac2en позволяют сделать вывод о том, что механизм действия нейраминидаз вирусов гриппа А и В одинаков [6].

### ИНГИБИТОРЫ НЕЙРАМИНИДАЗ И МЕХАНИЗМЫ УСТОЙЧИВОСТИ ВИРУСОВ К ИХ ДЕЙСТВИЮ

Структура активного центра консервативна не только между подтипами, но и типами фермента, что указывает на важность всех составляющих его компонентов, а также эволюционно-отлаженную систему его функционирования. Данное наблюдение позволило разработать ингибитор NA вируса гриппа, напоминающий переходное состояние реакции гидролиза, а также Neu5Ac2en (рис. 2а), а именно 4-гуанидино-Neu5Ac2en, который сейчас применяется в медицине под названием занамивир [14] (рис. 2б).

Успех занамивира инициировал цикл работ по дизайну новых ингибиторов NA. Основным элементом структуры нового класса ингибиторов (без кислородного атома в цикле) являются шести- или пятичленные циклы.

Одним из таких соединений стала (3S,4R,5R)-3-амино-4-ацетамидо-5-(1-этилпропокси)-1-циклогексен-1-карбоновая кислота (озелтамивир, или тамифлю, Tamiflu) (рис. 2в). Структура этого вещества «подогнана» к координатам тех остатков активного центра, которые взаимодействуют с глицериновой цепью Neu5Ac2en [20]. Успех применения данного соединения стимулировал разработку новых ингибиторов NA, содержащих гидрофобные группы [21].

Кроме того, синтезирован ингибитор NA на основе циклопентанового кольца, где сохранены все функционально важные фрагменты занамивира (карбоксил, ацетамид, С4-гидроксил и глицериновый), которые вписываются в активный центр NA. Только ориентация гуанидиновой группы отличается от таковой у занамивира. Однако это различие имеет свои преимущества: ВСХ-1812 (преамивир) (рис. 2г) сохраняет ингибирующую активность по отношению к занамивир-устойчивым вариантам вируса гриппа [22]. В настоящее время ведутся разработки аналогов этого соединения [23].

Занамивир и озелтамивир уже используются как лекарственные препараты, а ВСХ-1812 находится на последней стадии клинических испытаний.

До недавнего времени считалось, что активное неконтурируемое применение озелтамивира и занамивира не повлияет значимо на ситуацию с появлением резистентных штаммов вируса гриппа. Т.е. даже при появлении резистентности устойчивые вирусы не смогут эффективно реплицироваться в отсутствие ингибитора [24]. В клинических исследованиях резистентные вирусы составляли менее 1 %, доля их среди сезонных вирусов гриппа по всему миру была того же порядка.

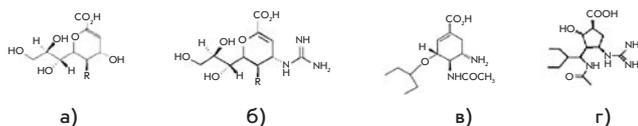


Рис. 2. Структура а) Neu5Ac2en, б) 4-занамивира, в) озелтамивира, г) ВСХ-1812 (преамивира), где R=NHAc

Но в январе 2008 года данная ситуация резко изменилась: некоторые из вирусов гриппа подтипа H1N1 приобрели устойчивость к озелтамивиру за счет мутации His274Tyr в NA [25], а в эпидемическом сезоне 2008–2009 годов устойчивость достигла практически 100 % среди вирусов, выделенных от пациентов (по данным <http://ecdc.europa.eu>); характерно, что все эти вирусы сохраняли чувствительность к занамивиру. Мутация His274Tyr ранее обнаруживалась в исследованиях устойчивости *in vitro* и *in vivo*, а также в клинических изолятах [26]. Тем не менее полностью прекращать использование данного лекарства рано, так как, по последним данным, циркулирующий в настоящее время в человеческой популяции предпандемический вирус H1N1 подтипа (A/California/11/2009) пока чувствителен к озелтамивиру (по данным центра по контролю и предотвращению опасных заболеваний США ([www.cdc.gov](http://www.cdc.gov))), что оставляет надежду на то, что штамм вируса гриппа, который вызовет следующую пандемию, будет чувствителен к данному ингибитору NA.

### ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ NA

Существуют данные о том, что NA необходима вирусу гриппа на различных стадиях инфекционного цикла. Во-первых, считается, что она облегчает подход вируса к клеткам-мишеням посредством удаления сиаловых кислот с муцинов респираторного тракта [26]. Во-вторых, может участвовать в процессе слияния вирусной частицы с клеткой [27]. В-третьих, помогает отпочковыванию созревших вирионов от поверхности клетки, предотвращая агрегацию вирусов, вызванную взаимодействием NA одного вириона с сиалилированными гликанами другого [27]. Кроме того, есть данные о том, что NA усиливает гемагглютинирующую активность NA посредством отщепления терминальных остатков нейраминовой кислоты от олигосахаридов, окружающих рецептор-связывающий участок NA [28].

Одной из наиболее интересных особенностей вируса гриппа является сосуществование двух белков, функции которых в какой-то степени антагонистичны, а именно: гемагглютинин выполняет рецептор-связывающую функцию, а нейраминидаза – рецептор-разрушающую. Так как оба эти белка узнают терминальный остаток нейраминовой кислоты, возникает вопрос о кооперации, или, наоборот, их конкуренции за рецептор/субстрат, а также о роли этих взаимоотношений в жизненном цикле вируса. Исследования вирусов, устойчивых к ингибиторам NA, искусственно полученных реассортантов (несущих NA и NA различного происхождения), а также полученных с помощью «обратной генетики» вирусов, лишенных активности NA или HA, – все это указывает на то, что NA и HA вируса гриппа действуют concertно и эволюционируют взаимозависимо [29–35]. Кроме того, возникает вопрос об их олигосахаридной специфичности, так как в организмах, которые являются хозяевами для вирусов гриппа, Neu5Ac-терминированные углеводные цепи весьма разнообразны.

### МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ NA

Одним из наиболее популярных субстратов для определения активности NA является MU-Neu5Ac или MU-NANA (рис. 3а). Метод, основанный на его использовании,

был впервые предложен [36] как альтернатива колориметрическим и радиоактивным методам. MU-Neu5Ac при отщеплении нейраминной кислоты образует флуоресцентное соединение, возбуждаемое светом с длиной волны 360 нм, и максимумом флуоресценции при pH 10. Ближайшим аналогом MU-Neu5Ac является 4-трифторметилумбеллиферил- $\alpha$ -N-ацетилнейраминная кислота, максимум флуоресценции которой находится при нейтральных значениях pH. Высокая интенсивность флуоресценции (в 10 раз выше, чем для MU-Neu5Ac) дает преимущества при анализе нейраминидаз низкой активности [37].

Чувствительность хемилюминесцентного метода определения активности NA [38] на два порядка выше, чем MU-Neu5Ac-теста, в качестве субстрата здесь используется субстрат «NA-Star» (рис. 3б). Недостатком данного метода является короткое время жизни хемилюминесцентного продукта гидролиза, который должен быть зарегистрирован в течение 5 мин.

Другая группа методов основана на отщеплении нейраминной кислоты от высокомолекулярных субстратов, таких как фетуин,  $\alpha_1$ -кислый гликопротеин или целые эритроциты. Как правило, далее определяют количество отщепившейся нейраминной кислоты [39]; наиболее удобный тиобарбитуратный метод измерения количества Neu5Ac позволяет делать это в присутствии исходного сиаилированного субстрата [40].

Альтернативный подход основан на определении второго продукта гидролиза – десиалилированного гликопротеина с помощью лектина (например, *Peanut agglutinin*), специфичного к освободившейся терминальной галактозе [41, 42]. Этот метод требует особого внимания к контролям, так как в любом гликопротеине изначально присутствуют терминальные  $\beta$ -Gal остатки.

### МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ

Под субстратной специфичностью NA понимают способность фермента дискриминировать сиаловые кислоты (например, Neu5Ac и Neu5Gc), тип связи сиаловой кислоты с последующим остатком (2–3, 2–6 или 2–8), а также внутренние участки углеводной цепи. В частности, для определения специфичности использовались:

- свободные трисахариды (3' SiaLac и 6' SiaLac) [43–45];
- гликопротеины, содержащие или только 2–3, или только 2–6-связанную нейраминную кислоту [45, 46];
- пересиалилированные с помощью 2–3-или 2–6-сиалил-трансфераз гликопротеины или эритроциты [47].

Методы, основанные на использовании этих субстратов, решают только одну из трех перечисленных задач, а именно выявляют специфичность на уровне Sia2-3Gal или Sia2-6Gal. Специфичность в более широком смысле может быть

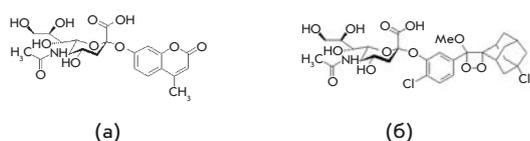


Рис. 3. Структура MU-Neu5Ac (а) и NA-Star (б)

определена с помощью метода, основанного на применении набора синтетических субстратов. В работе [42] использован набор из трех олигосахаридов: 3'SiaLac, 6'SiaLac и 6'SiaLacNAc, в виде конъюгатов с полиакриламидом; нейраминидазную активность определяли с помощью лектина, специфичного к появляющимся в результате действия NA остаткам галактозы (см. выше). Недавно был разработан простой и чувствительный метод определения субстратной специфичности NA [48], основанный на использовании сиа-лилолигосахаридов, меченных BODIPY. Флуоресцентная метка ковалентно соединена с олигосахаридом (3'SiaLac, 3'SiaLacNAc, SiaLe<sup>c</sup>, SiaLe<sup>a</sup>, SiaLe<sup>x</sup>, 6'SiaLac, 6'SiaLacNAc) через спейсер, т.е. удалена от сайта расщепления. Преимуществами данной метки являются стабильность, относительная гидрофильность, электронейтральность, небольшой размер и возможность использовать стандартный флуоресцеиновый фильтр при ее детекции. Ступ метода заключается в количественном разделении электронеutralного продукта реакции и отрицательно-заряженного непрореагировавшего субстрата, что делается либо на микрокартридже с анионообменной смолой, либо с помощью планшетов, полупроницаемое дно которых состоит из анионообменного материала. Для большей достоверности можно определять количество не только продукта, но и непрореагировавшего субстрата. Высокая чувствительность метода позволяет работать с низкими концентрациями как субстратов ( $10^{-11}$  моль), так и вирусов. Высокая достоверность (больше 95 %) и хорошая воспроизводимость (98 %) нового метода позволяют изучать кинетические характеристики фермент-субстратного взаимодействия. Исследование кинетики десиалилирования, а именно скорости реакции и ее зависимости от концентрации субстрата реакции и фермента, важно для понимания механизма реакции, а также для выбора правильного концентрационного диапазона. В свою очередь, правильный диапазон позволяет изучать специфичность десиалилирования, когда экспериментатор не знает точно количества NA в образце [49]. Следует подчеркнуть, что только этот подход позволяет изучать субстратную специфичность NA в широком смысле (см. выше), т.е. влияние типа сиаловой кислоты, типа связи между ней и следующим остатком, а также внутренних остатков гликана.

### ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ НЕКОТОРЫХ НЕЙРАМИНИДАЗ ВИРУСА ГРИППА

Как уже упоминалось выше, для исследования активности и специфичности NA вирусов гриппа возможно применение как высокомолекулярных, так и низкомолекулярных субстратов. Низкомолекулярные субстраты позволяют изучать механизм и кинетику десиалилирования, неосложненные мультивалентностью взаимодействия (NA является тетрамером) и возможным влиянием NA, который взаимодействует с мультивалентным конъюгатом на 3–5 порядков сильнее, чем с мономерным [50]. Высокомолекулярные субстраты являются более корректной моделью для исследования взаимодействий, наиболее приближенных к реальным, т.е. когда необходимо принимать во внимание такие факторы, как тетрамерность NA, кластерность экспонирования молекул NA на клетке, а также соучастие в процессе десиалилирования второго белка вируса гриппа, NA, которого на поверхности вириона значительно больше.

Большой интерес представляет исследование эволюции субстратной специфичности вирусов гриппа, выделенных от человека, а также ее сравнение со специфичностью вирусов других хозяев, таких как утки и свиньи. Первое может дать ответ на вопрос о том, чем обусловлена уникальность пандемических НА, а второе – заранее выявлять те свойства фермента, которые необходимы ему для пересечения видового барьера.

Специфичность нейраминидазы подтипа N2 вирусов человека постепенно изменилась от 3'SiaLac (штаммы H2N2 1957 года) к двойственной специфичности, т.е. 3'SiaLac/6'SiaLac (штаммы между 1972 и 1987 годами). Гидролитическую активность по отношению к 6'SiaLac регистрировали только у вирусов, выделенных, начиная с 1967 года, а начиная с 1972 года наблюдалось увеличение активности по отношению к этому субстрату [46].

Недавно было показано, что вирусы N2 высокоактивны по отношению к 3'SiaLac, тогда как для 6'SiaLac активность варьирует от предельно низкой (у птичьих и ранних человеческих вирусов) до высокой (у свиных вирусов и современных человеческих вирусов). Показано, что активность НА по отношению к 6'SiaLac зависит также от вида хозяина, а для вирусов человека – и от года изоляции [45].

Для штаммов N1 70–80-х годов выделения [43, 44] было показано, что нейраминидаза практически одинаково узнает 3'SiaLac и 6'SiaLac.

С помощью BODIPY-меченных синтетических олигосахаридов [48–51] получены данные по субстратной специфичности N1 и N2 НА некоторых изолятов вирусов гриппа уток, свиней и человека. Все исследованные НА десилилировали  $\alpha$ 2–3-субстраты лучше, чем  $\alpha$ 2–6-варианты. В случае вирусов с N1 нейраминидазой соотношение активностей  $\alpha$ 2–3/ $\alpha$ 2–6 составляет ~60 для вируса утки, ~20 для вирусов свиней и ~4 для человеческого вируса. В случае вирусов подтипа H9N2 сходные соотношения  $\alpha$ 2–3/ $\alpha$ 2–6 наблюдаются для вируса утки, в то время как для вирусов домашней птицы данное соотношение находится в пределах от 30 до 15, а для вируса свиней ~6, наконец, для вируса человека ~10. Было показано для всех НА вирусов человека, что они различают тонкую структуру  $\alpha$ 2–3-субстратов, т.е. узнают природу внутренних участков углеводных цепей сиалоолигосахаридов.

При использовании полиакриламидных конъюгатов с 3'SiaLac, 6'SiaLac и 6'SiaLacNAc было показано, что большая часть вирусов (подтипы H1N1 и H3N2), выращенных на куриных эмбрионах и клетках MDCK, предпочтительно расщепляет 3'SiaLac, а VERO-изоляты тех же вирусов предпочтительно гидролизуют 6'SiaLacNAc. Таким образом, на субстратную специфичность НА влияет природа хозяйской клетки, используемой для накопления вируса [42]; причина этого явления остается невыясненной.

Результаты изучения субстратной специфичности, полученные разными авторами, как правило, трудно сопоставимы, так как использовались не только различные штаммы вирусов, но и различные субстраты или кардинально разные концентрации субстратов. Так, если Кобаса [45] показал, что максимальная активность НА по отношению к 6'SiaLac не превышает активности по отношению к 3'SiaLac, то в работе Баум и Паульсона [46] она была гораздо выше для тех же вирусов. Следует также отметить, что еще

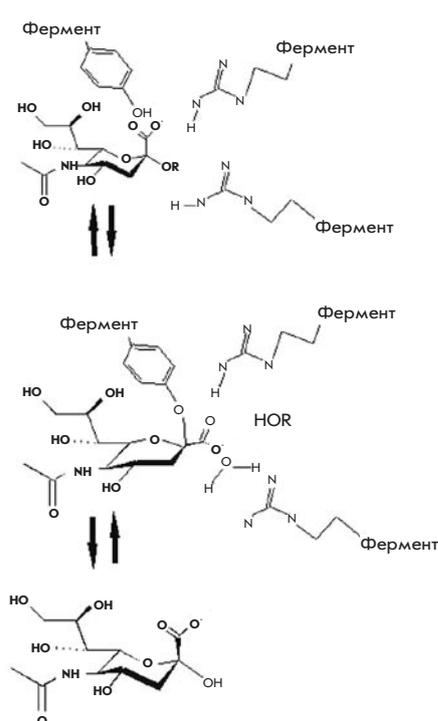


Схема Механизм десилилирования субстрата нейраминидазой вируса гриппа (по [7], [15] и [16])

ни разу при определении специфичности вируса гриппа не использовались одновременно как низко-, так и высокомолекулярные субстраты известной структуры.

Несмотря на ограниченность опубликованных на данный момент результатов, уже выявляются некоторые закономерности. Во-первых, субстратная специфичность НА человеческих вирусов гриппа отличается от таковой вирусов гриппа птиц. Во-вторых, олигосахаридная специфичность НА вирусов гриппа, циркулирующих в различных видовых популяциях (птицы, свиньи, человек), заметно отличается по крайней мере по параметру «отношение скоростей гидролиза 2–3-олигосахаридов к 2–6-олигосахаридам». В-третьих, субстратная специфичность нейраминидаз вирусов, выращенных на различных клетках, может быть различной.

Данные о функционировании НА будут неполными, если не брать в расчет второй поверхностный белок вируса гриппа, гемагглютинин. Работ, где одновременно проводилось исследование субстратной специфичности НА и NA, а также исследовалась их связь с инфекционными свойствами вируса гриппа, практически нет. Представленные в данном обзоре новые методы исследования НА теперь «догнали» более продвинутые, разрабатывавшиеся с опережением методы исследования НА; поэтому несложно предсказать, что одной из основных тенденций в изучении вируса гриппа ближайших лет будет именно совместное изучение активности и специфичности НА и NA. ●

Обзор написан при поддержке гранта № 04-04-49669 Российского фонда фундаментальных исследований, а также гранта «Молекулярная и клеточная биология» Президиума РАН.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Varghese J.N., Colman P.M. Three-dimensional structure of the neuraminidase of influenza virus A/Tokyo/3/67 at 2.2 Å resolution. // *J. Mol. Biol.* 221: 473–486 (1991).
2. Colman P.M. NA enzyme and antigen. // In *The influenza viruses* (R. M. Krug, ed.). Plenum Publishing Corporation, New York: 175–218. 1989.
3. Russell R.J., Haire L.F., Stevens D.J., Collins P.J., Lin Y.P., Blackburn G.M., Hay A.J., Gamblin S.J., Skehel J.J. The structure of H5N1 avian influenza neuraminidase suggests new opportunities for drug design. // *Nature*. 44: 45–49. 2006.
4. Harris A., Cardone G., Winkler D.C., Heymann J.B., Brecher M., White J.M., Steven A.C. Influenza virus pleiomorphy characterized by cryoelectron tomography. // *PNAS*. 103:19123–19127. 2006.
5. Varghese J.N., Colman P.M., van Donkelaar A., Blick T.J., Sharasrabudhi A., McKimm-Breschkin J.L. Structural evidence for a second sialic acid binding site in avian influenza virus neuraminidases. // *Biochem.* 94: 11808–11812. 1997.
6. Bossart-Whitaker P., Carson M., Babu Y.S., Smith C.D., Laver W.G., Air G.M. Three-dimensional structure of influenza A N9 neuraminidase and its complex with the inhibitor 2-deoxy-2,3-dehydro-N-acetyl neuraminic acid. // *J. Mol. Biol.* 232: 1069–1083. 1993.
7. Janakiram M.N., White C.L., Laver W.G., Air G.M., and Luo M. Structure of influenza virus neuraminidase B/Lee/40 complexed with sialic acid and dehydro analog at 1.8-Å resolution: implications for the catalytic mechanism. // *Biochem.* 33: 8172–8179. 1994.
8. Takahashi T., Suzuki T., Hidari K.I.-P.J., Miyamoto D., Suzuki Y. A molecular mechanism for the low-pH stability of sialidase activity of influenza A virus N2 neuraminidases. // *FEBS Lett.* 543: 71–75. 2003.
9. Colman P.M., Hoynes P.A., Lawrence M.C. Sequence and structure alignment of parainfluenza hemagglutinin-neuraminidase with influenza virus neuraminidase. // *J. Virol.* 67: 2972–2980. 1993.
10. Varghese J.N., Colman P.M., van Donkelaar A., Blick T.J., Sharasrabudhi A., McKimm-Breschkin J.L. Structural evidence for a second sialic acid binding site in avian influenza virus neuraminidases. // 94: 11808–11812. 1997.
11. Matrosovich M.N., Krauss S., Webster R.G. H9N2 influenza A viruses from poultry in Asia have human virus-like receptor specificity. // *Virol.* 281: 56–162. 2001.
12. Li S., Schulman J., Itamura S., Palese P. Glycosylation of neuraminidase determines the neurovirulence of influenza A/WSN/33 virus. // *J. Virol.* 67: 6667–6673. 1993.
13. Saito T., Kawano K. Loss of glycosylation at Asn144 alters the substrate preference of the N8 influenza A virus neuraminidase. // *J. Vet. Med. Sci.* 59: 923–926. 1997.
14. von Itzstein M., Wu W.-Y., Kok G.B., Pegg M.S., Dyason J.C., Jin B., Phan T.V., Smythe M.L., White H.F., Oliver S.W., Colman P.M., Varghese J.N., Ryan D.M., Woods J.M., Bethel R.C., Hotham V.J., Cameron J.M., Penn C.R. Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. // *Nature* 363: 418–423. 1993.
15. Watts A.G., Oppezzo P., Withers S.G., Alzari P.M., Buschiazzo A. Structural and Kinetic Analysis of Two Covalent Sialosyl-Enzyme Intermediates on *Trypanosoma rangeli* Sialidase. // *J. Biol. Chem.* 281: 4149–4155. 2006.
16. von Itzstein M. The war against influenza: discovery and development of sialidase inhibitors. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 6: 967–74. 2007.
17. Watts A.G., Withers S.G. The synthesis of some mechanistic probes for sialic acid processing enzymes and the labeling of a sialidase from *Trypanosoma rangeli*. // *Can. J. Chem.* 82: 1581–1588. 2004.
18. Colman P.M., Smith B.J. The trypanosomal trans-sialidase: two catalytic functions associated with one catalytic site. // *Structure* 10: 1466–1468. 2002.
19. Oxford J.S., Bossuyt S., Eswarasaran R., Lambkin R. Drugs to combat the epidemic and pandemic faces of influenza. // In *Influenza* (C.W. Potter ed.) Elsevier: 201–234. 2002.
20. Hanessian S., Wang J., Montgomery D., Stoll V., Stewart K.D., Kati W., Maring C., Kempf D., Hutchins C., Laver W.G. Design, synthesis, and neuraminidase inhibitory activity of GS-4071 analogues that utilize a novel hydrophobic paradigm. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12: 3425–3429. 2002.
21. Babu Y.S., Chad P., Bantia S., Kotian P., Dehgan A., El-Kattan Y., Lin T.-H., Hutchison T.L., Elliot A., Parker C., Ananth S., Horn LaSun L., Laver G., Montgomery J. BCX-1812 (RWJ-270201): discovery of a novel highly potent, orally active, and selective influenza neuraminidase inhibitor through structure-based drug design. // *J. Med. Chem.* 43: 3482–3486. 2000.
22. Bianco A., Brufani M., Dri D.A., Melchioni C., Filocamo L. Design and synthesis of a new furanonic silylimimetic as a potential influenza neuraminidase inhibitor. // *Letters in organic chemistry* 2: 83–88. 2005.
23. Blick T.J., Sahasrabudhe A., McDonald M., Owens I.J., Morley P.J., Fenton R.J., and McKimm-Breschkin J.L. The interaction of hemagglutinin and neuraminidase mutations in influenza virus in resistance to 4-guanidino-Neu5Ac2en. // *Virol.* 246: 95–103. 1998.
24. Lackenby A., Hungnes O., Dudman S.G., Meijer A., Paget W.J., Hay A.J., Zambon M.C. Emergence of resistance to oseltamivir among influenza A (H1N1) viruses in Europe. // *EUROSURVEILLANCE* 13. 1–2. 2008.
25. Hui-Ling Y., Ilyushina N.A., Salomon R., Hoffmann E., Webster R.G., Govorkova E.A. Neuraminidase Inhibitor-Resistant Recombinant A/Vietnam/1203/04 (H5N1) Influenza Viruses Retain Their Replication Efficiency and Pathogenicity In Vitro and In Vivo. // *J. Virol.* 81: 12418–12426. 2007.
26. Matrosovich M., Matrosovich T., Gray T., Roberts N.A., Klenk H.-D. Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. // *J. Virol.* 78: 12665–12667. 2004.
27. Wagner R., Wolf T., Herwig A., Pleschka S., Klenk H.-D. Interdependence of hemagglutinin glycosylation and neuraminidase as regulators of influenza growth: a study by reverse genetics. // *J. Virol.* 74: 6316–6323. 2000.
28. Ohuchi M., Feldmann A., Ohuchi R., Klenk H.D. Neuraminidase is essential for fowl plague virus hemagglutinin to show hemagglutinating activity. *Virology*. Sep 10;212(1):77–83. 1995.
29. Rudneva I.A., Kovaleva V.P., Varich N.L., Farashyan V.R., Gubareva L.V., Yamnikova S.S., Popova I.A., Presnova V.P., Kaverin N.V. Influenza A virus reassortants with surface glycoprotein genes of avian parent viruses: effects of HA and NA gene combinations on virus aggregation. // *Arch. Virol.* 133: 437–450. 1993.
30. Rudneva I.A., Sklyanskaya E.I., Barulina O.S., Yamnikova S.S., Kovaleva V.P., Tsvetkova I.V. and Kaverin N.V. Phenotypic expression of HA – NA combinations in human – avian influenza A virus reassortants. // *Arch. Virol.* 141: 1091–1099. 1996.
31. Kaverin N.V., Gambaryan A.S., Bovin N.V., Rudneva I.A., Shilov A.A., Khodova O.M., Varich N.L., Sinitin B.V., Makarova N.V., Kropotkina E.A. Postreassortment changes in influenza A virus hemagglutinin restoring HA – NA functional match. // *Virol.* 244: 315–321. 1998.
32. Castrucci M.R., Kawaoka Y. Biologic importance of neuraminidase stalk length in influenza A virus. // *J. Virol.* 67: 759–764. 1993.
33. Mitnaul J., Matrosovich M.N., Castrucci M.R., Tuzicov A.B., Bovin N.V., Kobasa D., Kawaoka Y. Balanced hemagglutinin and neuraminidase activities are critical for efficient replication of influenza A viruses. // *J. Virol.* 74: 6015–6020. 2000.
34. Wagner R., Wolf T., Herwig A., Pleschka S., Klenk H.-D. Interdependence of hemagglutinin glycosylation and neuraminidase as regulators of influenza growth: a study by reverse genetics. // *J. Virol.* 74: 6316–6323. 2000.
35. Hughes M., Matrosovich M., Rodges M., McGregor M., Kawaoka Y. Influenza A viruses lacking sialidase activity can undergo multiple cycles of replication in cell culture, eggs, or mice. // *J. Virol.* 74: 5206–5212. 2000.
36. Potier M., Mamei L., Belisle M., Dallaire L., Melancon S.B. Fluorometric assay with a sodium (4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-N-acetylneuraminic) substrate. // *Anal. Biochem.* 94: 287–296. 1979.
37. Engstler M., Talhouk J.W., Smith R.E., Schauer R. Chemical synthesis of 4-trifluoromethylumbelliferyl- $\alpha$ -D-N-acetylneuraminic acid glycoside and its use for the fluorometric detection of poorly expressed natural and recombinant sialidases. // *Anal. Biochem.* 250: 176–180. 1997.
38. Buxton R.C., Edwards B., Joo R.R., Voyta J.C., Tisdale M., Bethel R.C. Development of a sensitive chemiluminescent neuraminidase assay for the determination of influenza virus susceptibility to zanamivir. // *Anal. Biochem.* 280: 291–300. 2000.
39. Jourdain G.W., Dean L., Roselman S. A periodate-resorcinol method for the quantitative estimation of five sialic acids and their glycosides. // *Am. J. Hyg.* 43: 430–435. 1971.
40. Warren L. The thiobarbituric acid assay of sialic acids. // *J. Biol. Chem.* 234: 1971–1975. 1959.
41. Lambre C.R., Terzidis H., Greffard A., Webster R.G. Measurement of anti-influenza neuraminidase antibody using a peroxidase-linked lectin and microtitre plates coated with natural substrates. // *J. Immunol. Meth.* 135: 49–57. 1990.
42. Katinger D., Mochalova L., Chinarev A., Bovin N., and Romanova J. Specificity of neuraminidase activity from influenza viruses isolated in different hosts tested with novel substrates. // *Arch. Virol.* 149: 2131–2140. 2004.
43. Rudneva I.A., Kovaleva V.P., Varich N.L., Farashyan V.R., Gubareva L.V., Yamnikova S.S., Popova I.A., Presnova V.P., Kaverin N.V. Influenza A virus reassortants with surface glycoprotein genes of avian parent viruses: effects of HA and NA gene combinations on virus aggregation. // *Arch. Virol.* 133: 437–450. 1993.
44. Couceiro J.N.S.S., Baum L.J. Characterization of the hemagglutinin receptor specificity and neuraminidase substrate specificity of clinical isolates of human influenza A viruses. // *Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio de Janeiro* 89: 587–591. 1994.
45. Kobasa D., Kodihalli S., Luo M., Castrucci M.R., Donatelli I., Suzuki Y., Suzuki T., Kawaoka Y. Amino acid residues contributing to the substrate specificity of the influenza A virus neuraminidase. // *J. Virol.* 73: 6743–6751. 1999.
46. Baum L.G., Paulson J.C. The N2 neuraminidase of human influenza virus has acquired a substrate specificity complementary to the hemagglutinin receptor specificity. // *Virol.* 180: 10–15. 1991.
47. Paulson J.C., Weinstein J., Dorland L., van Halbeek H., Viegant J.F.J. Newcastle disease virus contains a linkage-specific glycoprotein sialidase. // *J. Biol. Chem.* 257: 12734–12738. 1982.
48. Mochalova L.V., Korchagina E.Y., Kurova V.S., Shtyrya Y.A., Gambaryan A.S., Bovin N.V. Fluorescent assay for studying the substrate specificity of neuraminidase. // *Anal. Biochem.* 341, 190–193. 2005.
49. Mochalova L., Kurova V., Shtyrya Y., Korchagina E., Gambaryan A., Belyanchikov I., Bovin N.V. Oligosaccharide specificity of influenza H1N1 virus neuraminidases. // *Arch. Virol.* 152, 2047–2057. 2007.
50. Gambaryan A.S., Matrosovich M.N. A solid-phase enzyme-linked assay for influenza virus receptor-binding activity. // *Journal of Virological Methods.* 39, 111–123. 1992.
51. Shtyrya Y.A., Mochalova L.V., Gambaryan A.S., Korchagina E.Y., Xu X., Klimov A.I., Bovin N.V. Neuraminidases of H9N2 influenza viruses isolated from different hosts display various substrate specificity. // *Proceedings of international conference on options for the control of influenza VI held in Toronto, Ontario, Canada June 17–23. 2007.* Editor Jacqueline M. Katz., International Medical Press. 64–65. 2008.

УДК 577.33 : 541.14

# Компьютерное моделирование строения и спектров флуоресцентных белков

А.В. Немухин<sup>1,2\*</sup>, Б.Л. Григоренко<sup>1</sup>, А.П. Савицкий<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3, ГСП-1, МГУ

<sup>2</sup> Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4

<sup>3</sup> Институт биохимии имени А.Н. Баха РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33, стр. 2

\*E-mail: anemukhin@yahoo.com

**РЕФЕРАТ** Флуоресцентные белки семейства зеленого флуоресцентного белка активно используются как биомаркеры в живых системах. Ответственной за поглощение света и флуоресценцию является хромофорная группа, в основе которой – молекула гидроксibenзилиден-имидазолина, формирующаяся в природных условиях из трех аминокислотных остатков внутри белковой глобулы и хорошо экранированная от внешней среды. Наряду с интенсивными экспериментальными исследованиями свойств флуоресцентных белков и соответствующих хромофоров биохимическими, кристаллографическими и спектральными методами для характеристики их строения и спектров в последние годы применяется компьютерное моделирование. В обзоре приведены наиболее интересные результаты молекулярного моделирования структурных параметров, оптических и колебательных спектров хромофорсодержащих областей флуоресцентных белков методами квантовой химии, молекулярной динамики и комбинированными подходами квантовой и молекулярной механики. Основное внимание уделено корреляции теоретических и экспериментальных данных и предсказательным возможностям моделирования, которые полезны для создания новых эффективных биомаркеров.

**Ключевые слова:** зеленый флуоресцентный белок, молекулярное моделирование, молекулярная динамика, молекулярная механика.

**Список сокращений:** комбинированные методы квантовой и молекулярной механики (КМ/ММ), молекулярная динамика (МД), метод теории функционала плотности с учетом зависимости от времени (TD-DFT).

## ВВЕДЕНИЕ

Открытие и применение цветных белков семейства зеленого флуоресцентного белка [1–7] привело к лавинообразному всплеску интереса исследователей к этим удивительным объектам. Их практическая ценность объясняется возможностью метить цветными белками клеточные клоны и затем в буквальном смысле наблюдать за ходом внутриклеточных событий. Биотехнологические перспективы связаны с многоцветной маркировкой, в частности с возможностями наблюдать за межбелковыми взаимодействиями в живых системах. Достаточно полно характеризованные в кристаллографических исследованиях, эти белки имеют бочкообразную структуру (рис. 1), состоящую из плотно подогнанных β-листов, хорошо экранирующих от внешней среды хромофорную группу, в основе которой – молеку-

ла гидроксibenзилиден-имидазолина (рис. 2), формирующаяся в природных условиях из трех аминокислотных остатков внутри белковой глобулы. Превращения, происходящие с хромофорной группой внутри этой макромолекулы при освещении определенными длинами волн, лежат в основе фотофизических свойств флуоресцентных белков.

Изучению всех аспектов строения и механизмов действия флуоресцентных белков посвящены усилия исследователей разных специальностей. В настоящем обзоре преимущественно анализируются работы по компьютерному моделированию структуры и спектров этих систем. Применение современных приемов молекулярного моделирования [8] может оказать заметную поддержку экспериментальным работам, позволяя существенно снизить

временные и материальные затраты на всестороннее исследование механизмов процессов, протекающих в столь сложных молекулярных системах. Понятно, что описание переходов между электронными состояниями хромофорных молекул, ответственных за поглощение и излучение света, требует применения квантовой теории, и адекватным инструментом моделирования в этом отношении является квантовая химия. Конформационные состояния белковой макромолекулы и структура хромофорсодержащей области также крайне важны для свойств флуоресцентных белков, что определяет применение методов молекулярной механики и молекулярной динамики. Все эти подходы требуют значительных компьютерных ресурсов, а также наличия эффективных алгоритмов и компьютерных программ.

Модели квантовой химии основаны на представлении молекулярных систем как совокупности ядер и электронов, что приводит к необходимости численного решения уравнения Шредингера с использованием приближений разного уровня точности. В настоящее время существует достаточно развитая иерархия квантовохимических подходов, каждый из которых ориентирован на определенные задачи. В частности, для расчетов структурных параметров, т.е. для определения геометрических конфигураций точек минимальной энергии на потенциальной поверхности основного электронного состояния модельной молекулярной системы, и для расчетов колебательных спектров сейчас чаще всего применяют методы теории функциона-

ла электронной плотности. Для расчетов характеристик возбужденных электронных состояний, включая расчеты энергий переходов между состояниями, позволяющие оценивать положения полос в оптическом спектре или нахождение точек конических пересечений, предпочтительны построения с многоконфигурационными волновыми функциями [9]. На практике используются известные пакеты программ квантовой химии, наиболее популярные из которых: GAUSSIAN, GAMESS, MOLPRO, NWCHEM, TURBOMOLE.

В методах молекулярной механики и молекулярной динамики поверхности потенциальной энергии, которые в квантово-химических моделях подлежат прямому расчету, аппроксимируются аналитическими функциями, учитывающими растяжения химических связей, деформацию валентных и двугранных углов, взаимодействие валентно несвязанных атомов, электростатические вклады, иногда и другие добавки. Для каждого подобного вклада в энергию записывается выражение, содержащее параметры, и подбору этих параметров (т.н. силовых полей) уделялось и продолжает уделяться внимание большого числа исследовательских групп. Для компьютерного моделирования белковых систем популярны наборы параметров силовых полей AMBER, CHARMM, OPLSAA, GROMOS и др.

Определенный прорыв в развитии молекулярного моделирования свойств биомолекулярных систем связан с внедрением т.н. комбинированных методов квантовой и молекулярной механики (КМ/ММ). Согласно основной

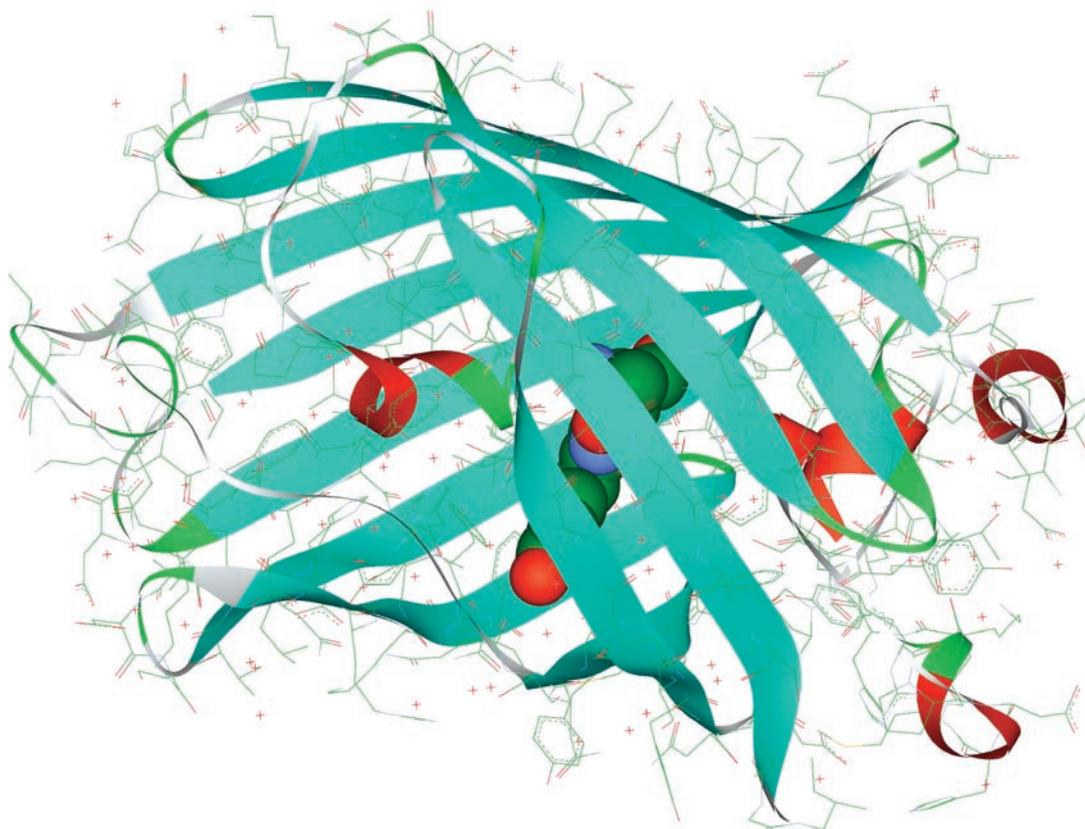
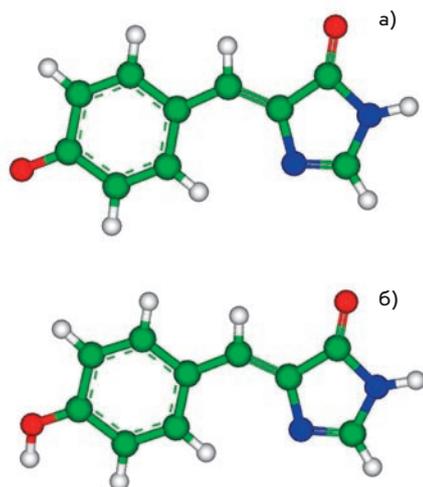


Рис. 1. Структура GFP (PDB ID: 1EMA). Выделена хромофорная группа



**Рис. 2.** Молекула хромофора GFP. Верхняя часть (а): анионная форма; нижняя часть (б): нейтральная форма. Здесь и далее зеленым цветом выделены атомы углерода, красным – кислорода, синим – азота

идее этого подхода [10], меньшая часть белковой макромолекулы, в которой важны перераспределения химических связей или переходы между электронными состояниями, включается в квантовую подсистему, и энергии и силы в ней рассчитываются различными методами квантовой химии. Большинство же атомов, окружающих эту выделенную центральную часть, относится к молекулярно-механической подсистеме, моделируемой силовыми полями. В приближениях КМ/ММ энергия каждой точки на потенциальной поверхности складывается из энергии квантовой части в поле ММ-подсистемы и молекулярно-механической энергии. Расчеты и анализ подобных композитных поверхностей потенциальной энергии позволяют исследовать фотофизические процессы с хромофорными молекулами с учетом белковой матрицы.

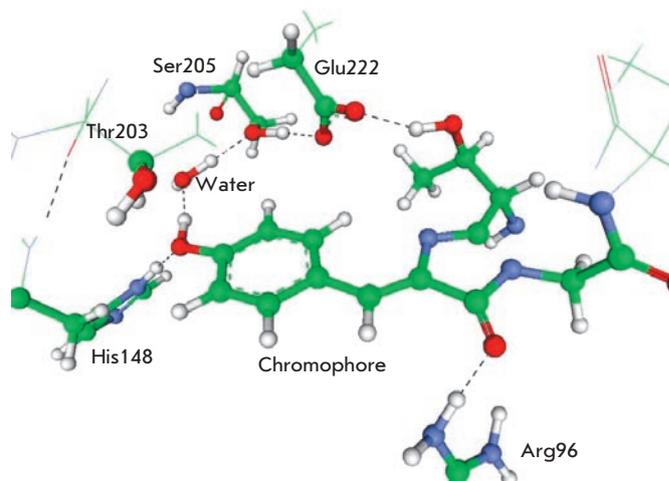
Далее мы рассмотрим наиболее интересные результаты молекулярного моделирования структурных параметров, оптических свойств и колебательных спектров хромофорсодержащих областей флуоресцентных белков методами квантовой химии, молекулярной динамики и комбинированными подходами КМ/ММ. Основное внимание уделено корреляции теоретических и экспериментальных данных и предсказательным возможностям моделирования.

### МОДЕЛИРОВАНИЕ СТРУКТУРЫ И ДИНАМИКИ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КЛАССИЧЕСКИХ СИЛОВЫХ ПОЛЕЙ

Макромолекулы флуоресцентных белков содержат лишь пептидные группы, для которых известны наборы параметров силовых полей общепринятых библиотек молекулярной механики и молекулярной динамики (МД). Однако в самой хромофорной группе, формирующейся в результате циклизации аминокислотных остатков с участием кислорода, встречаются новые типы атомов. В работе Ройтер и др. [11] сообщаются параметры, совместимые с силовым полем CHARMM, для молекулы 4'-гидроксипенилиден-2,3-диметилимидазолинона – модели хромофорной группы зеленого флуоресцентного белка GFP, которые были подобраны по результатам квантово-химических расчетов. Первые работы по вычислениям и анализу достаточно коротких классических МД траекторий [11, 12] для нативно-

го и мутированного вариантов GFP проводились на основе координат тяжелых атомов кристаллографических структур 1EMA, 1EMV из базы данных белковых структур [13]. Здесь уместно заметить, что координаты атомов, которые помещаются в эту базу данных на основании экспериментальных исследований методами рентгеноструктурного анализа или ядерно-магнитного резонанса, очень часто предварительно уточняются по компьютерным расчетам с программами, основанными на методе молекулярной механики. Моделирование позволяет достроить недостающие атомы водорода в модельных структурах белковых макромолекул, хотя и возникают известные неоднозначности, прежде всего для остатков гистидина, глутаминовой и аспарагиновой кислот. Кроме демонстрации достаточной жесткости белковой глобулы в работах [11, 12] приведены карты распределений водородных связей около хромофорной группы как в нейтральной, так и в анионной формах. Для иллюстрации пользы этой информации мы приводим на рис. 3 картину водородных связей около хромофора GFP, полученную в наших оригинальных расчетах.

Известные оптические свойства GFP [14] – наличие двух главных полос поглощения около 400 нм и 480 нм (для нативного типа белка) – связываются с возможностью нахождения хромофорной группы как в нейтральном состоянии с коротковолновым поглощением (форма А, рис. 2а), так и в ионизированном состоянии с длинноволновым поглощением (форма В, рис. 2б). Поскольку сеть водородных связей должна обеспечивать перемещение протонов, связывающее эти две формы (как считается, через промежуточную конформацию I), то анализу ее строения, а также моделированию переноса протонов уделялось большое внимание с самых первых работ. В этом разделе мы упоминаем только теоретические работы, выполненные с классическими моделями. В частности, в рамках метода молекулярной механики анализировалась роль вращения боковой цепи Thr203 (рис. 3), предположительно способствующего переходу между формами А и В [15]. По результатам де-



**Рис. 3.** Иллюстрация сети водородных связей (черный пунктир) около хромофора GFP. Нумерация аминокислотных остатков соответствует структуре PDB ID: 1EMA

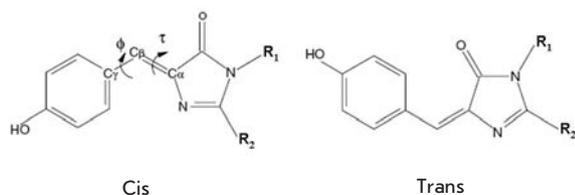


Рис. 4. Цис-транс-изомеризация хромофора GFP

тальных молекулярно-динамических расчетов в работах [16, 17] были сформулированы предположения о путях переноса протонов между различными формами хромофора с участием молекул воды и боковых цепей ближайших аминокислотных остатков. Последствия миграции протонов по сетям водородных связей, причем достаточно протяженным – вплоть до выхода на поверхность белка, для интерпретации фотофизических процессов с GFP, обсуждаются в работах [18, 19].

По результатам расчетов методами молекулярной механики в работах [20–22] и молекулярной динамики в работах [23–25] анализировалось другое важнейшее преобразование в флуоресцентных белках, а именно цис-транс-изомеризация хромофорной группы (рис. 4). Наибольшее значение цис-транс-изомеризация может иметь для т.н. мерцающих цветных белков, в которых флуоресцентные состояния, возникающие на определенное время в зависимости от внешних факторов, чередуются с темными состояниями. Основная рабочая гипотеза объяснения механизма подобных явлений основана на допущении цис-транс-изомеризации хромофорной группы внутри белка для достижения флуоресцентного состояния и его тушения. В следующих разделах настоящей статьи, в которых рассматриваются результаты квантовых расчетов, этой гипотезе также уделяется значительное внимание.

Весьма интересным результатом моделирования цис-транс-изомеризации хромофора с учетом белкового окружения, кроме того, иллюстрирующий современные возможности метода классической молекулярной динамики, сообщается в недавней работе [25]. Авторы построили профили свободной энергии (профили потенциала средней силы) для температуры 300 К вдоль угла внутреннего вращения  $\phi$  (рис. 4) для хромофора GFP в белковой матрице мутанта Ser65Thr, включая все атомы белка и почти 9000 молекул воды, образующих сольватную оболочку. При этом авторы модифицировали параметры силового поля AMBER (используя результаты квантово-химических расчетов), так чтобы они могли относиться к возбужденному электронному состоянию. Была использована т.н. направленная молекулярная динамика, стимулируя вращение вокруг угла  $\phi$ , с помощью которой удается вывести модельную систему из режима небольших осцилляций около положения минимума энергии и проанализировать обширные области конфигурационного пространства. По результатам расчетов найдено, что для перевала через энергетический барьер и, соответственно, для того чтобы сдвинуться в сторону цис-транс-изомеризации хромофора по координате  $\phi$ , надо затратить примерно 8 ккал/моль.

В работе [23], в частности, описаны результаты моделирования методами классической МД процесса транс-цис-изомеризации хромофора другого цветного белка, asCP (или asFP595) [26], для которого характерна разгорающаяся флуоресценция. Это означает, что для перевода изначально нефлуоресцентной формы белка в состояние с красным свечением необходимо облучение белка интенсивным зеленым светом, что предположительно связано с фотоиндуцированной транс-цис-изомеризацией хромофорной группы. Расчеты траекторий [23, 27], которые были проведены с параметрами силового поля OPLSAA, позволяют составить наглядное представление о возможных движениях хромофора и ближайших аминокислотных остатков при предполагаемых процессах.

В работе [28] методами классической МД изучалась возможность цис-транс-изомеризации хромофора в основном электронном состоянии в белке Dronpa [29], для которого наблюдается индуцированное светом переключение от флуоресцентного к темному состоянию. Как и в случае других фотопереключаемых цветных белков, проверяется гипотеза, что именно изомеризация хромофора ответственна за изменение фотофизических свойств белка. Авторы [28] использовали силовое поле AMBER с добавлениями необходимых параметров для хромофорной молекулы по результатам квантово-химических расчетов. Было показано, что хромофорная группа остается в цис-конформации, но точечные мутации по позициям ближайших аминокислотных остатков способствуют повышению подвижности белковой макромолекулы.

Недавно группой с факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова [30] метод классической МД был использован для моделирования структурных особенностей мономерного красного флуоресцентного белка mRFP1 при точечных мутациях по позиции Glu66.

В конце этого раздела следует отметить, что методам молекулярной механики и молекулярной динамики пока нет альтернативы при моделировании конформационных состояний белков. Расчет равновесных координат атомов и анализ эволюции со временем геометрических параметров белковых макромолекул с числом атомов порядка нескольких тысяч может быть практически осуществлен только в рамках классической механики с эмпирическими или полумэмпирическими силовыми полями. Несомненным достижением подобного моделирования для флуоресцентных белков является анализ распределений водородных связей в хромофорсодержащей области, поскольку параметры общепринятых силовых полей AMBER, CHARMM неплохо калиброваны на описание водородных связей. Что касается рассчитываемых энергетических характеристик, например, энергетических барьеров внутреннего вращения при цис-транс-изомеризации хромофора и в основном, и тем более в возбужденном состоянии, то к этим результатам следует относиться с осторожностью, понимая их высокую чувствительность к не столь надежно определенным параметрам силовых полей. Качественные результаты МД моделирования – эволюция со временем сетки водородных связей, грубые оценки энергетических барьеров при конформационных превращениях при движении пептидных групп или хромофорных групп – безусловно, полезны и предоставляют важную

информацию. Для более аккуратных оценок характеристик химических превращений, включая перемещения протонов по сетям водородных связей, и для анализа сечений поверхностей потенциальной энергии в основном и в возбужденных состояниях необходимо обращаться к квантовым расчетам.

### КВАНТОВАЯ ХИМИЯ ХРОМОФОРОВ В ГАЗОВОЙ ФАЗЕ И В РАСТВОРАХ

Первые же квантово-химические расчеты электронной структуры модельной молекулы хромофора GFP [31–34] позволили четко отнести индуцированное светом электронное возбуждение (фотопоглощение) к переходу между синглетными состояниями  $S_0 \rightarrow S_1$ . В терминах орбиталей этому соответствует переход электрона с высшей занятой молекулярной орбитали (ВЗМО)  $\pi$ -типа на низшую вакантную молекулярную орбиталь (НВМО)  $\pi^*$ -типа. На рис. 5 изображен вид этих орбиталей для анионной формы молекулы 4-гидроксibenзильден-имидазолинона (также рис. 4), рассчитанных в работе [35]. Важное заключение, которое следует из рассматривания вида орбиталей – возбуждение меняет локальные характеристики электронной плотности в районе мостикового фрагмента, связывающего фенильное и имидазолиновое кольца хромофорной группы. В результате выравниваются характеристики исходных (в основном состоянии) ординарной (C–CH) и двойной (–CH=C) химических связей, что потенциально облегчает

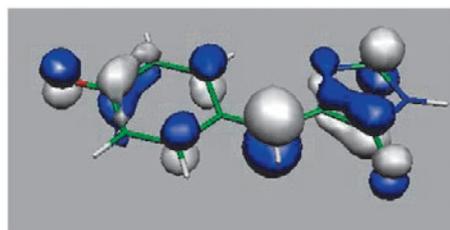
внутреннее вращение вокруг первоначально двойной связи (угол  $\tau$  на рис. 4).

Вопрос о как можно более точном расчете важнейших количественных характеристик хромофорных групп цветных белков семейства GFP – разностей энергий при возбуждении ( $S_0 \rightarrow S_1$ ) и возврате в основное состояние ( $S_1 \rightarrow S_0$ ), что сопоставляется с положениями максимумов полос в спектрах поглощения и флуоресценции, и соответствующих интенсивностей, а также рельефов поверхностей потенциальной энергии и в основном, и в возбужденном состоянии, что необходимо для объяснения фотопревращений с хромофорными группами, постоянно обсуждается среди специалистов по вычислительной квантовой химии. По-видимому, первый обзор ранних расчетов приведен в работе Хелмса [36], одно из недавних обсуждений достижений квантовой химии для отдельных молекул хромофоров содержится в работе [37]. Методические аспекты квантово-химических приближений для моделирования фотохимических процессов с органическими молекулами достаточно подробно изложены в обзорных статьях [9, 38, 39]. Чтобы не увязнуть в названиях и деталях приближений квантовой химии, используемых в настоящее время для компьютерных расчетов характеристик органических хромофоров в основном и в возбужденных электронных состояниях, мы ограничимся лишь достаточно поверхностным описанием наиболее употребляемых подходов. Мы позволим себе приводить некоторые устоявшиеся сокращения, обозначенные латинскими буквами.

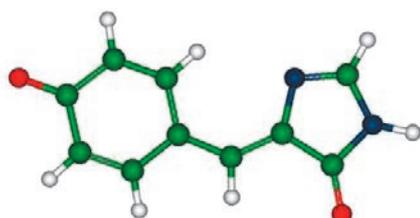
Расчет равновесных геометрических параметров молекул с числом атомов до сотни в основном электронном состоянии с очень хорошей точностью не представляет большой проблемы. Как правило, методами теории функционала электронной плотности (DFT), которыми уверенно владеет множество химиков, можно рассчитать трехмерную геометрическую структуру хромофорной молекулы и детально рассмотреть ее на мониторе с помощью подходящей компьютерной программы визуализации.

Трудности моделирования оптических спектров связаны с необходимостью соблюдать сопоставимую точность при расчетах основного состояния с доминирующей электронной конфигурацией... $\pi^2$  и возбужденного состояния с доминирующей конфигурацией... $\pi^1\pi^{*1}$  (многоточие перед ВЗМО  $\pi$ -типа относится ко всему набору предшествующих молекулярных орбиталей, которые дважды заселены электронами). Вообще говоря, и в основном состоянии неплохо учитывать смешивание электронных конфигураций, что видно из графа резонансных структур, например, анионной формы хромофора GFP (рис. 6). Соответственно, подходящими представляются подходы квантовой химии с многоконфигурационными волновыми функциями. Весьма часто встречающееся в фотохимии органических молекул обозначение CASSCF (т.е. для метода самосогласованного поля в полном пространстве активных орбиталей) относится именно к многоконфигурационным приближениям квантовой химии.

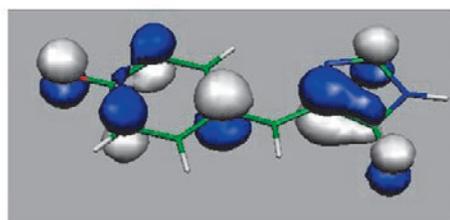
Поскольку работа с многоконфигурационными приближениями требует навыка, наличия мощной вычислительной техники и терпения (надо долго ждать результатов), возникает соблазн использовать что-нибудь попроще. И в первых работах по расчетам спектров поглощения



НВМО



гидроксibenзильден-имидазолинон



ВЗМО

Рис. 5. Средняя часть: молекула гидроксибензильден-имидазолинона в цис-анионной форме, моделирующая хромофорную группу GFP; нижняя часть: высшая занятая молекулярная орбиталь (ВЗМО); верхняя часть: низшая вакантная молекулярная орбиталь (ВЗМО)

хромофоров цветных белков [31–33, 40, 41], и в работах последних лет [27, 42, 43] часто получаются довольно неплохие результаты для положений максимумов оптических полос и интенсивностей с использованием действительно очень простых полуэмпирических методов типа ZINDO [44], в которых удачным подбором параметров по реперным экспериментальным данным скомпенсированы существенные упрощения теории электронной структуры молекул. Как всегда бывает с полуэмпирическими подходами, заранее не ясно, в каких конкретных случаях они приведут к успеху, а в каких – к большим ошибкам.

Еще более сложна ситуация с другим современным методом расчета разностей энергий основного и возбужденного электронных состояний, который становится весьма популярным среди пользователей квантово-химических компьютерных программ вследствие простоты его применения – методом теории функционала плотности с учетом зависимости от времени (TD-DFT). В ряде случаев метод TD-DFT дает прекрасное согласие с экспериментальными данными для положений максимумов полос поглощений в оптических спектрах органических хромофоров, но в других случаях результаты существенно более скромные [35], причем причины неудач несут принципиальный характер [45] из-за ошибок в описании состояний с переносом заряда, которые как раз характерны для подобных молекул.

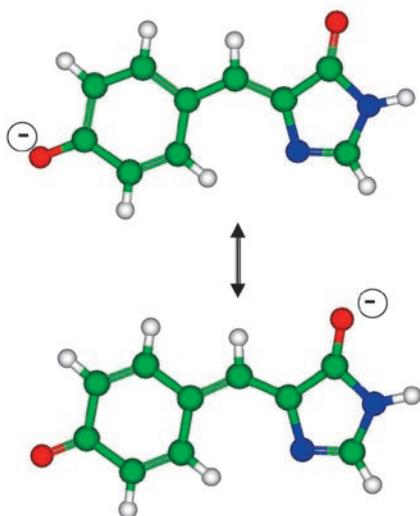
Если сравнивать достижения этих двух «дружественных для пользователя» методов расчета параметров полос в спектрах поглощения хромофоров цветных белков, ZINDO и TD-DFT, то уже в первой работе [41], в которой, в частности, моделировались свойства хромофора красного флуоресцентного белка DsRed [46], отмечалось, что результаты, полученные с использованием ZINDO, ближе к экспериментальным данным, чем с TD-DFT. В недавней работе [42] сравнение вычисленных спектральных характеристик анионов хромофоров белков GFP и DsRed проводится с результатами экспериментальных оценок методами фоторазрушающей спектроскопии в газовой фазе [47–49]. Для анионной формы хромофора GFP (экспериментальное значение положения полосы поглощения – 479 нм [47,

48]) метод ZINDO позволяет получить 477–481 нм, а вычисленное методом TD-DFT положение интенсивной полосы поглощения (390 или 405 нм в зависимости от деталей расчетной схемы) существенно отличается от экспериментальной величины. Для анионной формы модельного хромофора, синтезированного по мотивам хромофорной группы белка DsRed, экспериментально получено положение полосы поглощения 521 нм [49], в расчетах методом ZINDO – 533 нм, в расчетах методом TD-DFT – 449 нм. Подобный же вывод можно сделать по результатам работы [43], в которой вычислялись спектральные параметры аниона хромофора GFP, – метод ZINDO позволяет получить практически совпадающее с экспериментальным положение полосы поглощения, а метод TD-DFT значительно завышает вертикальную энергию возбуждения с отличием от экспериментальной длины волны (479 нм) на 50–90 нм в синюю сторону. Тем не менее снова отметим, что к предсказаниям полуэмпирического подхода ZINDO следует относиться с осторожностью, причем не понятно, каким образом его можно систематически улучшать, в отличие от подхода TD-DFT, для совершенствования которого рано или поздно будут найдены более надежные представления функционала электронной плотности. Пока что регулярно появляются все новые публикации, в которых приводятся результаты расчетов энергий возбуждения хромофорных молекул от различных цветных белков в разных вариантах приближения TD-DFT [27, 35, 37, 50–55].

Вернемся к более обоснованным в квантовой теории, но «недружественным для пользователя» методам на основе многоконфигурационных приближений, применение которых требует значительных компьютерных ресурсов и наличия опыта квантово-химических расчетов. Потенциально именно эти методы необходимы для решения более широкого класса задач, чем расчеты полос поглощения молекул хромофоров, а именно вычисления сечений поверхностей потенциальной энергии возбужденных электронных состояний с локализацией геометрических конфигураций точек минимумов (с последующим расчетом спектров флуоресценции), точек сближения энергетических поверхностей возбужденного и основного состояний – т.н. точек конических пересечений, в окрестности которых происходит безызлучательное гашение фотовозбуждения, проводятся в рамках многоконфигурационных подходов.

Применение более простых [34] и более сложных [37, 55, 56] вариантов, в которых учитывается простое смешивание электронных конфигураций (устоявшийся термин в квантово-химической литературе – «взаимодействие конфигураций») для вычислений разностей энергий основного и возбужденных состояний хромофорных молекул в вакууме, позволяет в хороших приближениях давать оценки для положений полос в оптических спектрах с характерными ошибками в интервале 20–50 нм. Дополнительные усилия (см. [9, 38, 39] для знакомства с деталями) затрачиваются на оптимизацию орбиталей, входящих в многоконфигурационные волновые функции, чтобы сделать эти орбитали подходящими «в среднем» для основного и возбужденных электронных состояний, и на оптимальный выбор числа орбиталей, заселяемых электронами в основном и возбужденных состояниях, – таким образом приходят к методу CASSCF с усреднением по состояниям,

Рис. 6. Резонансные структуры анионной формы хромофора GFP



SA-CASSCF, который в настоящее время представляется базовым для расчетов потенциальных поверхностей возбужденных состояний органических хромофоров. Для достижения большей точности к энергиям метода SA-CASSCF добавляют поправки по теории возмущений, и только после этого удается уменьшить погрешности при оценках максимумов положений полос в оптических спектрах газофазных хромофоров до 15–20 нм. Примеры столь изощренных расчетов приведены в работах [37, 57, 58] для хромофора GFP, [59] – для хромофора asFP595. В работах [58, 59] рассмотрены различные состояния протонирования хромофорных молекул.

На рис. 7 показана схема, иллюстрирующая возможные превращения хромофорной молекулы (на примере GFP) при фотовозбуждении. При переходе из точки минимальной энергии в основном состоянии  $S_0$  на потенциальную поверхность возбужденного состояния  $S_1$  за счет релаксации геометрических параметров молекула может оказаться в энергетическом минимуме, из которого возможна флуоресценция. Движение по потенциальной поверхности возбужденного состояния может привести к точке конического пересечения  $S_1/S_0$  с достаточно измененной геометрической конфигурацией молекулы, через которую осуществляется возврат в основное состояние.

Подобная картина, которую можно надежно рассчитать только методами квантовой химии на основе SA-CASSCF, предоставляет важнейшую информацию о фотофизических процессах с хромофорными молекулами. Первое такое исследование для анионной формы хромофора GFP для вакуумных условий было описано в работе [57]. Позже были выполнены расчеты для газофазных хромофоров зеленого (GFP) и красных (DsRed, asFP595) белков в анионной форме для цис- и транс-конформаций [60–62]. Объяснение фотоизомеризации хромофорных групп возможно только после анализа подробных картин.

Кроме расчетов возбужденных состояний методы квантовой химии применялись для вычислений геометрических структурных параметров, колебательных спектров и для анализа возможных перегруппировок в основном электронном состоянии в модельных системах, описывающих хромофорную молекулу с соседними молекулярными группами, по мотивам белковой структуры. Первые такие расчеты для достаточно большого молекулярного кластера, моделирующего хромофорсодержащую область GFP, описаны в работе [63]. Авторы работы [64] рассчитали в рамках кластерной модели пути переноса протонов вдоль водородных связей (рис. 3) в хромофорсодержащей области GFP в основном электронном состоянии. Найдено, что активационные барьеры для подобных перемещений достаточно небольшие.

Колебательные спектры различных протонированных форм хромофора GFP были рассчитаны в работе [65] с использованием достаточно популярной неэмпирической молекулярной динамики Кара-Паринелло – методики, основанной на оценках сил, действующих на ядра атомов, приближенным решением квантовых уравнений по теории функционала электронной плотности. В последующей работе [66] рассмотрена модель хромофорсодержащей области GFP большего размера. Проведено прямое сопоставление с результатами экспериментальных исследова-

ний спектров комбинационного рассеяния GFP и молекулы хромофора. Рассчитанные по той же методике полосы в колебательном спектре комбинационного рассеяния хромофоров DsRed сообщаются в работе [67]. В публикации [68] сообщается о результатах расчетов методами квантовой химии колебательных спектров для хромофорных молекул GFP в различных состояниях протонирования. Несмотря на бесспорную пользу расчетов колебательных спектров для небольшой модельной системы, состоящей из хромофорной группы в газовой фазе, очевидны и недостатки такого подхода, прежде всего связанные с недостаточным учетом белкового окружения (даже с включением в модельную систему упрощенных молекулярных групп пептидных цепей). Более интересными представляются результаты подходов, в которых принимается во внимание влияние растворителя, например в работах [69, 70], рассмотренных далее.

Моделирование характеристик молекул хромофоров в растворе методами квантовой химии представляет важный этап в исследовании влияния молекулярного окружения конденсированных сред на их свойства. Обычно рассматриваются либо непрерывные модели, описывающие растворитель как среду с определенным значением диэлектрической постоянной, в полость которой вписывается молекула растворенного вещества, либо дискретные модели с явным введением молекул растворителя в анализируемую систему.

В работе [71] авторы использовали непрерывную модель растворителя и полуэмпирический метод расчета энергий электронного возбуждения [31] для оценок сольватохромных сдвигов оптических спектров хромофоров GFP

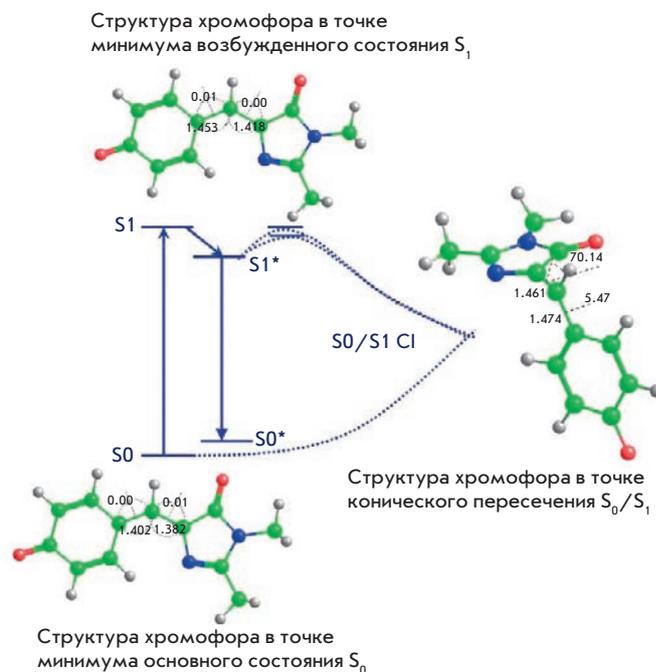


Рис. 7. Иллюстрация превращений хромофорной молекулы GFP в цис-анионной форме при фотовозбуждении

в различных протонированных состояниях при переходе от газовой фазы к этанолу. Отмечалась качественная корреляция между теоретическими и экспериментальными результатами.

Важные результаты были получены в работе [72], в которой диаграмма, иллюстрирующая фотопревращения нейтральной формы хромофора GFP (рис. 7), была рассчитана для модельной системы, включающей хромофорную молекулу в окружении явно заданных молекул воды. Были рассчитаны сечения поверхности потенциальной энергии основного и возбужденного состояний и определены координаты точек минимумов и конических пересечений. Для практического осуществления столь сложных расчетов была применена полуэмпирическая методика квантовой химии AM1 со специально подобранными для этой задачи параметрами. Главный вывод из этой работы, который активнее цитируется в литературе по исследованию флуоресцентных белков, сводится к тому, что растворитель на порядок уменьшает время жизни возбужденного электронного состояния хромофора по сравнению с газовой фазой. В отличие от вакуумных условий в окруженном молекулами растворителя хромофоре облегчается вращение вокруг двойной связи мостиковой группы (рис. 4). В недавней статье [73] моделирование молекулярной динамики нейтральной формы хромофора GFP в окружении молекул воды описано с использованием неэмпирического квантовомеханического приближения SA-CASSCF для расчетов потенциальных поверхностей. Подтвержден качественный вывод о большей эффективности тушения возбуждения в растворе по сравнению с газовой фазой.

В работах [70, 71] описаны расчеты колебательных спектров и энергетических профилей тушения фотовозбуждения различных протонированных форм хромофора GFP в водном растворе. Применены непрерывные модели растворителя (т.н. поляризационная континуальная модель, РСМ) и использованы неэмпирические методы квантовой химии на основе CASSCF для вычисления энергий на потенциальных поверхностях. Также подтверждена возрастающая эффективность внутренней конверсии в растворителе.

Другой подход к моделированию свойств модифицированного хромофора GFP в различных протонированных формах в цис- и транс-конфигурациях в водном растворе продемонстрирован в работе [52]. Распределение частиц в модельной системе, состоящей из хромофора и сольватной оболочки из 857 молекул воды, анализировалось методом Монте-Карло для условий NPT ансамбля. Для расчетов энергий хромофора в возбужденном состоянии применялись варианты TD-DFT и CASSCF, причем отмечались явные преимущества метода CASSCF. Проанализированы сольватные сдвиги в спектрах поглощения и возможность цис-транс-изомеризации хромофора в растворе. Та же методика применена и в последующей работе [74], в которой анализировались свойства хромофора DsRed.

Авторы работы [55] вычисляли положения максимумов полос поглощения в спектрах достаточно большой серии хромофоров типа GFP с модификациями в самой хромофорной молекуле, применяя непрерывную модель водного растворителя РСМ и различные варианты для расчетов энергий возбуждения. Сделан вывод о достаточно плохом

согласии теоретических и экспериментальных результатов, хотя качественные корреляции могут быть установлены. Синтетические молекулы на основе хромофора GFP также исследовались экспериментально в водном растворе в работе [75] с теоретическими оценками оптических спектров методом TD-DFT с учетом растворителя в рамках непрерывной модели РСМ.

В работе [76] оптические спектры хромофора белка asFP595, 2-ацетил-4-(п-гидроксibenзилиден)-1-метил-5-имидазолон были экспериментально исследованы в нескольких растворителях при различных значениях pH. В водном растворе полоса при 418 нм была отнесена к нейтральной, а полоса при 520 нм – к анионной формам молекулы хромофора. Положения максимумов полос поглощения в этаноле, пропаноле и диметилформамиде оказались значительно сдвинутыми по отношению к водной системе, причем не прослеживалась корреляция с соответствующими значениями диэлектрической постоянной растворителя. Моделирование спектров было выполнено для различных протонированных состояний хромофорной молекулы в цис- и транс-конформациях в растворах воды, этанола, ацетонитрила и диметилсульфоксида [35]. Использовалась непрерывная модель растворителя РСМ и метод TD-DFT для расчета энергий возбуждения. Данные, приведенные в табл., хорошо иллюстрируют соотношение экспериментальных и теоретических результатов. Очевидна качественная корреляция – и в том, и в другом случае отмечается слабая зависимость положений полос от растворителя. Очевидно отнесение более коротковолновой полосы поглощения к нейтральной форме хромофора, а более длинноволновой – к анионной, хотя количественные расхождения достаточно большие – до 50 нм. По экспериментальным данным нельзя отнести наблюдаемые спектры либо к транс-, либо к цис-конформации хромофора в растворе. Расчеты энергий обеих конформаций и в вакууме, и в водном растворе уверенно предсказывают энергию цис-конформации ниже примерно на 1.5 ккал/моль. Рас-

**Таблица.** Сравнение вычисленных [35] и измеренных [76] (жирным шрифтом в скобках) длин волн максимумов полос поглощения хромофора белка asFP595. Звездочкой отмечены величины, измеренные в диметилформамиде с  $\epsilon = 38.3$

Растворитель	Нейтральная форма	Анионная форма	Цвиттерионная форма
Цис-конформация			
Вакуум ( $\epsilon = 1$ )	430	484	521
Этанол ( $\epsilon = 24.3$ )	453 (425)	504 (542)	538
Ацетонитрил ( $\epsilon = 36.3$ )	453 (422*)	502 (572*)	537
ДМСО ( $\epsilon = 47.2$ )	458 (422*)	511 (572*)	545
Вода ( $\epsilon = 80$ )	453 (418)	502 (520)	537
Транс-конформация			
Этанол ( $\epsilon = 24.3$ )	438 (425)	476 (542)	504
Вода ( $\epsilon = 80$ )	437 (418)	474 (520)	538

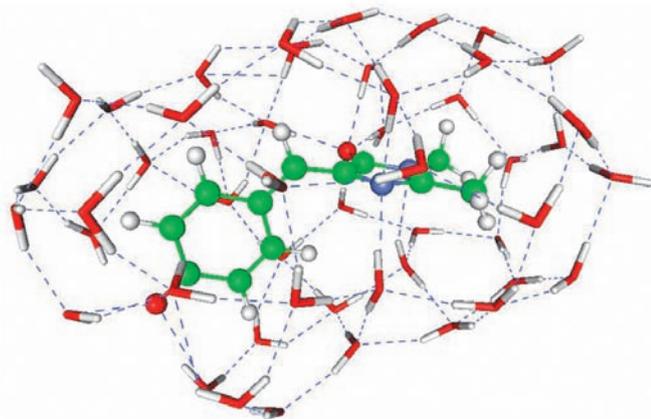


Рис. 8. Структура переходного состояния аниона хромофора GFP на пути от цис-изомера к транс-изомеру в оболочке из молекул воды

четы не подтверждают высказанную авторами работы [76] гипотезу о том, что слабая флуоресценция, наблюдаемая в растворе хромофорной молекулы в диметилформамиде, свидетельствует о близости оптических свойств этого раствора к свойствам белка asFP595.

Вопрос о возможности цис-транс-изомеризации хромофоров цветных белков в растворах обсуждается в течение достаточно длительного времени [77]. В экспериментах, описанных в работе [78], показано, что в водном растворе хромофор GFP, например в анионной форме, может переходить от одной конформации к другой с активационным энергетическим барьером, оцененным по кинетическим данным с уравнением Аррениуса, порядка 13 ккал/моль. В то же время ранние квантово-химические расчеты [33] приводили к барьерам более 50 ккал/моль. Это расхождение удалось сгладить только недавно – в работе [79] был рассчитан энергетический профиль для цис-транс-изомеризации аниона хромофора GFP в воде с весьма близкими к экспериментальным оценкам барьерами 10–11 ккал/моль, причем этот теоретический результат получается и в рамках новых версий непрерывных моделей растворителя, и в рамках дискретной модели с явным учетом молекул воды в первой сольватной оболочке. На рис. 8 изображена структура модельной системы в конформации на вершине активационного барьера при переходе от цис-изомера к транс-изомеру. В работе [79] показано, что для адекватного описания энергетического профиля реакции изомеризации необходимо использовать многоконфигурационные подходы квантовой химии.

Наконец упомянем еще об одном важном приложении компьютерного моделирования свойств хромофорных групп флуоресцентных белков в растворах – о расчетах констант кислотности (pKa). Эта информация весьма полезна для анализа свойств хромофоров в белковых матрицах, поскольку помогает составить представление о состоянии протонирования хромофора и путях переноса протонов по сетям водородных связей. Расчет значений pKa проводится с использованием термодинамического цикла, компонентами которого являются свободные энер-

гии депротонирования по позиции определенного атома в газовой фазе и свободные энергии сольватации протонированной молекулы, соответствующего аниона и свободная энергия сольватации протона. Необходимо провести серию квантово-химических вычислений параметров молекулярных частиц (включая равновесные геометрические параметры и частоты колебаний) в газовой фазе и в растворе, в последнем случае в рамках непрерывных моделей растворителя. Для кислородных и азотных центров хромофоров GFP подобная процедура и результаты вычислений описаны в работах [80–82]. Авторы работы [81] оценили значения pKa для возбужденного электронного состояния. В работе [82] приведены вычисленные величины pKa для хромофоров цветных белков asFP595 и zFP538 в транс- и цис-конформациях.

В заключение этого раздела следует подчеркнуть абсолютную необходимость квантово-химических расчетов для моделирования свойств хромофоров флуоресцентных белков, даже несмотря на их существенную ресурсоемкость. По мере совершенствования вычислительных методов квантовой химии они с неизбежностью будут становиться все более «дружественными для пользователя». Показательным примером является процедура расчета геометрической структуры (равновесных геометрических параметров в основном электронном состоянии) для молекул с числом атомов до 100 – весьма надежные результаты можно получать на персональных компьютерах, даже особенно не вникая в суть алгоритмов. Пока такой сервис недоступен для моделирования всего процесса фотовозбуждения, но со временем ситуация может измениться.

#### МОДЕЛИРОВАНИЕ СВОЙСТВ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ МЕТОДОМ КМ/ММ

Моделирование свойств хромофоров внутри белковой матрицы целесообразно проводить с применением комбинированных методов квантовой и молекулярной механики (КМ/ММ). Очевидно, что к квантовой подсистеме следует отнести хромофорную группу с проведением границы между КМ- и ММ-частями, так чтобы все сопряженные связи, ответственные за поглощение и испускание света, описывались квантовыми уравнениями. Также разумно включить в КМ-часть ближайшие к хромофорной молекуле боковые цепи аминокислотных остатков, которые могут участвовать в переносах протонов, затрагивающих хромофорную группу. Размер квантовой подсистемы может достигать сотни атомов для практически осуществимых расчетов. Рис. 9 иллюстрирует возможный вариант выбора КМ-подсистемы для расчетов методом КМ/ММ свойств белков семейства GFP. Хромофорная группа (здесь от белка asFP595) представлена в КМ-части практически полностью. Боковые цепи остатков Glu, His, Ser, а также молекула воды могут участвовать в переносе протонов. Боковая цепь Arg с положительным зарядом может оказывать значительное влияние на квантовую подсистему.

С подобным выбором модели в работах [83, 84] были выполнены расчеты структурных параметров и энергий хромофорсодержащих областей для белка asFP595, предполагая как транс-, так и цис-конформацию хромофора. Большая часть белковой макромолекулы (более 2000 атомов), окружающая выделенную квантовую подсистему,

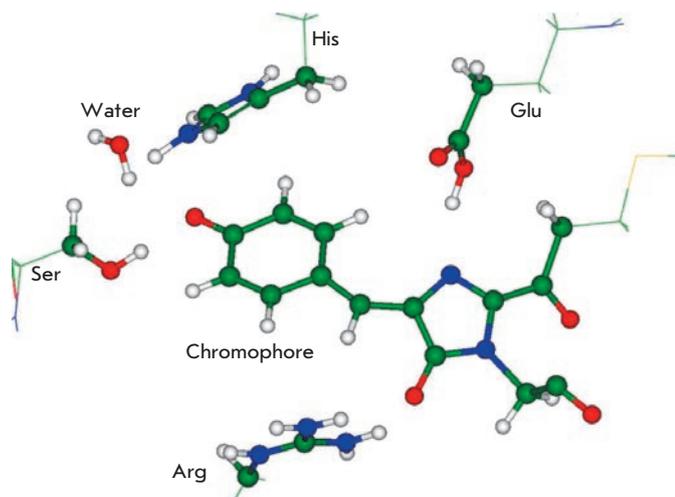


Рис. 9. Вариант выбора квантовой подсистемы (представление шарами и стержнями) для моделирования свойств флуоресцирующих белков семейства GFP методом КМ/ММ

была отнесена к ММ-подсистеме. Начальные координаты тяжелых атомов были взяты из кристаллографической структуры темной формы белка PDBID:1XMZ [85] с хромофором в транс-конформации. После добавления атомов водорода (или протонов) равновесная геометрическая конфигурация модельной белковой системы была рассчитана методом КМ/ММ с конформационно подвижными эффективными фрагментами [86, 87] с использованием квантово-химического приближения Хартри-Фока в квантовой части и силового поля AMBER в молекулярно-механической части. Вычисленные координаты атомов хорошо согласуются с кристаллографической структурой [83, 84]. Затем была пригнотовлена модельная структура с хромофорной группой внутри белковой матрицы в цис-конформации и снова оптимизированы координаты всех частиц методом КМ/ММ. Одним из важных результатов данного расчета является вывод, что энергия системы с транс-конформацией анионной формы хромофора ниже на 1.6 ккал/моль, чем энергия системы с цис-конформацией. В вакууме порядок конформаций по энергии обратный – цис-изомер изолированного хромофора должен быть более стабильным, чем транс-изомер. Таким образом, белковая матрица способствует большей стабилизации транс-изомера хромофора, что и наблюдается в рентгеноструктурных исследованиях [23, 85, 88]. Для полученных методом КМ/ММ структур модельных систем были также проведены оценки вертикальных энергий возбуждения в квантовой подсистеме в приближении TD-DFT. Найдено, что для структуры с цис-конформацией хромофора переходу  $S_0 \rightarrow S_1$  должна соответствовать более длинноволновая полоса в оптическом спектре. Этот результат также качественно согласуется с экспериментальными наблюдениями и рабочей гипотезой [23, 26, 89, 90], согласно которой asFP595 поглощает зеленый свет в состоянии с транс-конформацией хромофора и флуоресцирует в красной области в состоянии с цис-конформацией хромофора.

Попытки теоретически описать механизм разгорания флуоресценции белка asFP595 с использованием других вариантов метода КМ/ММ предпринимались в работах [27, 91]. Для расчетов точек на поверхностях потенциальной энергии основного и возбужденного состояний небольшой квантовой подсистемы применялись общепринятые подходы TD-DFT и SA-CASSCF. В работе [91] вычисляемые «на лету» силы использовались для расчетов траекторий с возможностью переходов с одной поверхности на другую при фотоизомеризации хромофорной группы в белке. Основное заключение моделирования сводится к утверждению о существенной связи состояния протонирования хромофорной группы в белке asFP595 с транс-цис-изомеризацией. Технически похожие приемы (траекторные расчеты с оценками сил «на лету» по квантовым уравнениям) для анализа фотодинамики белка GFP описаны в работе [73]. В серии работ [92–96] приведены результаты молекулярно-динамического моделирования переносов протонов по сетям водородных связей около хромофорной группы GFP с различными вариантами представления потенциальных поверхностей, в частности по данным квантово-химических расчетов.

В первых же приложениях метода КМ/ММ к расчетам свойств флуоресцентных белков [50, 51] была использована существенно более простая, но и менее надежная методика – структурные параметры белковой молекулы определялись с использованием полуэмпирического квантово-химического подхода AM1, и энергии возбуждения вычислялись в приближении TD-DFT. Таким образом оценивались полосы в оптических спектрах GFP [50] и синего флуоресцентного белка BFP [51] с модифицированной по отношению к GFP хромофорной группой.

В активно цитируемой работе [97] положения полос в оптическом спектре GFP, отвечающие вертикальным переходам  $S_0 \rightarrow S_1$  и  $S_1 \rightarrow S_0$ , вычислены в приближении КМ/ММ с использованием неэмпирических методов на основе CASSCF в квантовой подсистеме и силового поля CHARMM в ММ-подсистеме. Вычисленные положения полос неплохо согласуются с экспериментальными результатами – расхождения оцениваются в 20–30 нм. Серией расчетов с последовательно расширяющейся квантовой подсистемой исследовано, в частности, влияние на спектр заряженного аминокислотного остатка Arg, расположенного рядом с хромофорной группой (рис. 9).

Оптические спектры GFP и ряда его мутантов с перебором протонированных форм хромофорных групп рассчитаны в работе [98]. Авторы использовали для расчетов разностей энергий основного и возбужденного состояния в квантовой подсистеме вариант метода взаимодействия конфигураций, как и в предшествующих исследованиях газофазных хромофоров [56], но учли влияние белковой матрицы в рамках подхода КМ/ММ. Авторы сообщают о хорошем согласии рассчитанных и экспериментальных энергий переходов для поглощения и флуоресценции.

В работах [99, 100] описывается применение одной из версий т.н. многоуровневого квантово-химического подхода к расчетам свойств протяженных молекулярных систем – метода фрагментных молекулярных орбиталей (ФМО) для вычислений оптических спектров красных флуоресцентных белков DsRed и серии mFruits. Результаты полу-

чены в рамках различных вариантов приближения взаимодействия конфигураций для оценок разностей энергий основного и возбужденного состояний. Метод ГМО потенциально интересен возможностью вообще избежать применения эмпирических силовых полей молекулярной механики, отказаться от комбинированного подхода КМ/ММ при расчетах свойств белков и использовать только квантово-химические приближения для модельной системы.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За 10 лет, прошедшие после публикации первых статей, посвященных компьютерному моделированию свойств флуоресцентных белков и их хромофоров [12, 31, 33], накопилось достаточное количество результатов, многие из которых обсуждаются в этой работе. По-видимому, наибольший интерес представляет ответ на вопрос – что же полезное могут извлечь экспериментаторы из результатов компьютерного молекулярного моделирования. Обратимся к одной из последних публикаций обзорного характера, написанной авторитетными специалистами по исследованиям флуоресцентных белков Тонгом и Мичем [7], которые обращают внимание на избранные ими вычислительные работы (в этом параграфе цитируются только эти статьи). Анализ электронной структуры хромофорной молекулы гидроксibenzилиден-имидазолинона в основном и возбужденном электронном состоянии, выполненный уже в первых расчетах полуэмпирическими методами квантовой химии [32, 33], позволил связать фотофизические свойства GFP с локальными характеристиками мостикового фрагмента молекулы (рис. 2). А именно, увеличение порядка связи метиленой двойной связи при электронном возбуждении должно приводить к уменьшению барьера внутреннего вращения, облегчать внутреннюю конверсию и способствовать цис-транс-изомеризации хромофорной группы. Отмечается значение расчетов сечений потенциальных поверхностей, путей минимальной энергии вдоль угловых координат около мостикового фрагмента и конических пересечений для хромофорной молекулы как в изолированном состоянии, так и в модельном растворе, выполненных с постоянно усложняемыми квантово-химическими приближениями [57, 60, 61, 69, 72, 91, 101]. Поскольку подобные расчеты, которые явно учитывали бы влияние белковой матрицы на фотофизические свойства хромофора, достаточно сложны, отмечаются некоторые заключения о роли стерических затруднений со стороны пептидных групп для внутренней конверсии хромофорной молекулы, сформулированные по результатам моделирования ме-

тодами молекулярной механики [21, 22]. Кроме того, наличие рядом с хромофором заряженного аминокислотного остатка может существенно влиять на динамику фотовозбуждения, как показано расчетами методом КМ/ММ [97]. Моделирование методами молекулярной динамики (иногда в сочетании с квантово-химическими расчетами) [16, 28, 64, 92–96, 102, 103] позволяет наглядно представить пути перемещения протонов вдоль ориентированных сетей водородных связей в белках или превращения с хромофорными группами, что крайне важно для прогнозирования перспективных точечных мутаций, либо усиливающих, либо блокирующих эти пути.

Таким образом, весь арсенал современных средств компьютерного молекулярного моделирования – молекулярная механика, молекулярная динамика, квантовая химия и комбинированные методы квантовой и молекулярной механики (КМ/ММ), применению которых для симуляции структуры и спектров флуоресцентных белков посвящена настоящая статья, признается [7] вполне полезным подспорьем при экспериментальных исследованиях, в свою очередь ориентированных на практическое решение важных задач создания новых эффективных биомаркеров в живых системах путем направленной модификации природных объектов приемами геной инженерии [104].

Самым важным, но и самым трудоемким представляется прямой подход моделирования химических и фотофизических явлений в белках методом КМ/ММ. Будущий успех на этом пути зависит и от дальнейшего прогресса в создании суперкомпьютерных систем, и от развития эффективных алгоритмов решения уравнений квантовой механики, и, возможно даже в большей степени, от подготовки высококвалифицированных специалистов, способных разбираться в столь широком круге вопросов от биологии до вычислительной математики. Эти усилия будут оправданы, если удастся быстро снабжать биотехнологов надежными предсказаниями перспективных модификаций белковых макромолекул по результатам расчетов, хотя бы в той же мере, как компьютерное моделирование оказалось полезным при проектировании новых лекарственных препаратов [105]. ●

*При написании статьи использовались работы, поддержанные Российским фондом фундаментальных исследований (проект 07-03-00059) и Программой президиума РАН по молекулярной и клеточной биологии и Федеральным агентством по науке и инновациям (проект 02.522.11.2002).*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tsien R.Y. // Ann. Rev. Biochem. 1998. V. 67. P. 509–544.
2. Zimmer M. // Chem. Rev. 2002. V. 102. P. 759–781.
3. Лабац Ю.А., Гордеева А.В., Фрадков А.Ф. // Природа. 2003. № 3. С. 33–43.
4. Schmid J.A., Neumeier H. // ChemBioChem. 2005. V. 6. P. 1–9.
5. Remington S.J. // Curr. Opin. Struct. Biol. 2006. V. 16. P. 714–721.
6. Wachter R.M. // Photochem. Photobiol. 2006. V. 82. P. 339–344.
7. Tonge P.J., Meech S.R. // J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry. 2009. V. 205. P. 1–11.
8. Немухин А.В. // Соросовский образовательный ж. 1998. № 6. С. 48–52.
9. Robb M.A., Garavelli M., Olivucci M., Bernardi F. // in Rev. Comput. Chem., Eds. Lipkowitz K.B., Boyd D.B. Wiley. VCH Publishers. New York. 2000. V. 15. P. 87–146.
10. Warshel A., Levitt M. // J. Mol. Biol. 1976. V. 109. P. 227–249.
11. Reuter N., Lin H., Thiel W. // J. Phys. Chem. B. 2002. V. 106. P. 6310–6321.
12. Helms V., Straatsma T.P., McCammon J.A. // J. Phys. Chem. B. 1999. V. 103. P. 3263–3269.
13. Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E. // Nucl. Acids Res. 2000. V. 28. P. 235–242.
14. Chatteraj M., King B.A., Bublitz G.U., Boxer S.G. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 8362–8367.
15. Warren A., Zimmer M. // J. Molec. Graphics Model. 2001. V. 19. P. 297–303.
16. Lill M.A., Helms V. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. P. 2778–2781.
17. Patnaik S.S., Trohalaki S., Pachter R. // Biopolymers. 2004. V. 75. P. 441–452.

18. Agmon N. // *Biophys. J.* 2005. V. 88. P. 2452–2461.
19. Leiderman P., Huppert D., Agmon N. // *Biophys. J.* 2006. V. 90. P. 1009–1018.
20. Baffour-Awuah N.Y.A., Zimmer M. // *Chem. Phys.* 2004. V. 303. P. 7–11.
21. Maddalo S.L., Zimmer M. // *Photochem. Photobiol.* 2006. V. 82. P. 367–372.
22. Megley C.M., Dickson L.A., Maddalo S.L., Chandler G.J., Zimmer M. // *J. Phys. Chem. B.* 2009. V. 113. P. 302–308.
23. Andresen M., Wahl M.C., Stiel A.C., Grater F., Schäfer L.V., Trowitzsch S., Weber G., Eggeling C., Grubmüller H., Hell S.W., Jakobs S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. P. 13070–13074.
24. Nifosi R., Tozzini V. // *Chem. Phys.* 2006. V. 323. P. 358–368.
25. Vallverdu G., Demachy I., Ridard J., Lévy B. // *J. Molec. Struct. THEOCHEM.* 2009. V. 898. P. 73–81.
26. Lukyanov K.A., Fradkov A.F., Gurskaya N.G., Matz M.V., Labas Y.A., Savitsky A.P., Markelov M.L., Zarskiy A.G., Zhao X.N., Fang Y., Tan W.Y., Lukyanov S.A. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 25879–25882.
27. Schäfer L.V., Groenhof G., Klिंगen A.R., Ullmann G.M., Boggio-Pasqua M., Robb M.A., Grubmüller H. // *Angew. Chemie Int. Ed.* 2007. V. 46. P. 530–536.
28. Moors S.L.C., Michielsens S., Flors C., Dedecker P., Hofkens J., Ceulemans A. // *J. Chem. Theory Comput.* 2008. V. 4. P. 1012–1020.
29. Habuchi S., Ando R., Dedecker P., Verheijen W., Mizuno H., Miyawaki A., Hofkens J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. P. 9511–9516.
30. Khrameeva E.E., Drutsa V.L., Vrzhesheh E.P., Dmitrienko D.V., Vrzhesheh P.V. // *Biochemistry (Mosc).* 2008. V. 73. P. 1085–1095.
31. Voityuk A.A., Michel-Beyerle M.E., Rösch N. // *Chem. Phys. Lett.* 1997. V. 272. P. 162–167.
32. Voityuk A.A., Michel-Beyerle M.E., Rösch N. // *Chem. Phys.* 1998. V. 231. P. 13–25.
33. Weber W., Helms V., McCammon J.A., Langhoff P.W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. V. 96. P. 6177–6182.
34. Helms V., Winstead C., Langhoff P.W. // *J. Molec. Struct. THEOCHEM.* 2000. V. 506. P. 179–189.
35. Nemukhin A.V., Topol I.A., Burt S.K. // *J. Chem. Theor. Comput.* 2006. V. 2. P. 292–299.
36. Helms V. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2002. V. 12. P. 169–175.
37. Epifanovsky E., Polyakov I., Grigorenko B., Nemukhin A., Krylov A.I. // *J. Chem. Theor. Comput.* 2009. on-line
38. Sinicropi A., Andruniow T., De Vico L., Ferré N., Olivucci M. // *Pure Appl. Chem.* 2005. V. 77. P. 977–993.
39. Wanko M., Hoffmann M., Frauenheim T., Elstner M. // *J. Comput. Aided Mol. Des.* 2006. V. 20. P. 511–518.
40. Voityuk A.A., Michel-Beyerle M.E., Rösch N. // *Chem. Phys. Lett.* 1998. V. 296. P. 269–276.
41. Gross L.A., Baird G.S., Hoffman R.C., Baldrige K.K., Tsien R.Y. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. P. 11990–11995.
42. Wan S., Liu S., Zhao G., Chen M., Han K., Sun M. // *Biophys. Chem.* 2007. V. 129. P. 218–223.
43. Collins J.R., Topol I.A., Nemukhin A.V., Savitsky A.P. // *Proc. SPIE.* 2009. V. 7191. P. 71912.
44. Zerner M.C. // *Rev. Comput. Chem. Ed. Lipkowitz K.B. and Boyd D.B. VCH Publishing, New York.* 1991. V. 2. P. 313–366.
45. Dreuw A., Head-Gordon M. // *J. Am. Chem. Soc.* 2004. V. 126. P. 4007–4016.
46. Matz M.V., Fradkov A.F., Labas Y.A., Savitsky A.P., Zarskiy A.G., Markelov M.L., Lukyanov S.A. // *Nature Biotechnol.* 1999. V. 17. P. 969–973.
47. Nielsen S.B., Lapierre A., Andersen J.U., Pedersen U.V., Tomita S., Andersen L.H. // *Phys. Rev. Lett.* 2001. V. 87. P. 228102.
48. Andersen L.H., Lapierre A., Nielsen S.B., Nielsen I.B., Pedersen S.U., Pedersen U.V., Tomita S. // *Eur. Phys. J. D.* 2002. V. 20. P. 597–600.
49. Boyé S., Nielsen S.B., Krogh H., Nielsen I.B., Pedersen U.V., Bell A.F., He X., Tonge P.J., Andersen L.H. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2003. V. 5. P. 3021–3026.
50. Marques M.A.L., Lopez X., Varsano D., Castro A., Rubio A. // *Phys. Rev. Lett.* 2003. V. 90. P. 258101.
51. Lopez X., Marques M.A.L., Castro A., Rubio A. // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. V. 127. P. 12329–12337.
52. Xie D., Zeng X. // *J. Comp. Chem.* 2005. V. 26. P. 1487–1496.
53. Sun M. // *Int. J. Quant. Chem.* 2006. V. 106. P. 1020–1026.
54. Amat P., Granucci G., Buda F., Persico M., Tozzini V. // *J. Phys. Chem. B.* 2006. V. 110. P. 9348–9353.
55. Timerghazin Q.K., Carlson H.J., Liang C., Campbell R.E., Brown A. // *J. Phys. Chem. B.* 2008. V. 112. P. 2533–2541.
56. Das A.K., Hasegawa J.-Y., Miyahara T., Ehara M., Nakatsuji H. // *J. Comput. Chem.* 2003. V. 24. P. 1421–1431.
57. Martin M.E., Negri F., Olivucci M. // *J. Am. Chem. Soc.* 2004. V. 126. P. 5452–5464.
58. Bravaya K.B., Bochenkova A.V., Granovsky A.A., Nemukhin A.V. // *Russ. J. Phys. Chem. B.* 2008. V. 2. P. 671–675.
59. Bravaya K.B., Bochenkova A.V., Granovsky A.A., Savitsky A.P., Nemukhin A.V. // *J. Phys. Chem. A.* 2008. V. 112. P. 8804–8810.
60. Olsen S., Smith S.C. // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. V. 129. P. 2054–2065.
61. Olsen S., Smith S.C. // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. V. 130. P. 8677–8689.
62. Olsen S., McKenzie R.H. // *J. Chem. Phys.* 2009. V. 130. P. 184302.
63. Laino T., Nifosi R., Tozzini V. // *Chem. Phys.* 2004. V. 298. P. 17–28.
64. Zhang R.B., Nguyen M.T., Ceulemans A. // *Chem. Phys. Lett.* 2005. V. 404. P. 250–256.
65. Tozzini V., Nifosi R. // *J. Phys. Chem. B.* 2001. V. 105. P. 5797–5803.
66. Tozzini V., Bizzarri A.R., Pellegrini V., Nifosi R., Giannozzi P., Iuliano A., Cannistraro S., Beltram F. // *Chem. Phys.* 2003. V. 287. P. 33–42.
67. Tozzini V., Giannozzi P. // *ChemPhysChem.* 2005. V. 6. P. 1–4.
68. Yoo H.-Y., Boatz J. A., Helms V., J. Andrew McCammon J.A., Langhoff P.W. // *J. Phys. Chem. B.* 2001. V. 105. P. 2850–2857.
69. Altoè P., Bernardi F., Garavelli M., Orlandi G., Negri F. // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. V. 127. P. 3952–3963.
70. Altoè P., Bernardi F., Conti I., Garavelli M., Negri F., Orlandi G. // *Theor. Chem. Acc.* 2007. V. 117. P. 1041–1059.
71. Voityuk A.A., Kummer A.D., Michel-Beyerle M.E., Rösch N. // *Chem. Phys.* 2001. V. 269. P. 83–91.
72. Toniolo A., Olsen S., Manohar L., Martinez T.J. // *Faraday Discuss.* 2004. V. 127. P. 149–163.
73. Virshup A.M., Punwong C., Pogorelov T.V., Lindquist B.E., Ko C., Martínez T.D. // *J. Phys. Chem. B.* 2009. V. 113. P. 3280–3291.
74. Yan W., Zhang L., Xie D., Zeng J. // *J. Phys. Chem. B.* 2007. V. 111. P. 14055–14063.
75. Voliani V., Bizzarri R., Nifosi R., Abbruzzetti S., Grandi E., Viappiani C., Beltram F. // *J. Phys. Chem. B.* 2008. V. 112. P. 10714–10722.
76. Yampolsky I.V., Remington S.J., Martynov V.I., Potapov V.K., Lukyanov S., Lukyanov K.A. // *Biochem.* 2005. V. 44. P. 5788–5793.
77. Dong J., Abulwerdi F., Baldrige A., Kowalik J., Solntsev K.M., Tolbert L.M. // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. V. 130. P. 14096–14098.
78. He X., Bell A.F., Tonge P.J. // *FEBS Lett.* 2003. V. 549. P. 35–38.
79. Polyakov I., Epifanovsky E., Grigorenko B., Krylov A.I., Nemukhin A. // *J. Chem. Theor. Comput.* 2009. on-line
80. El Yazal J., Prendergast F.G., Shaw D.A., Pang Y.-P. // *J. Am. Chem. Soc.* 2000. V. 122. P. 11411–11415.
81. Scharnagl C., Raupp-Kossmann R.A. // *J. Phys. Chem. B.* 2004. V. 108. P. 477–489.
82. Nemukhin A.V., Topol I.A., Grigorenko B.L., Savitsky A.P., Collins J.R. // *J. Mol. Struct. THEOCHEM.* 2008. V. 863. P. 39–43.
83. Grigorenko B., Savitsky A., Topol I., Burt S., Nemukhin A. // *Chem. Phys. Lett.* 2006. V. 424. P. 184–188.
84. Grigorenko B., Savitsky A., Topol I., Burt S., Nemukhin A. // *J. Phys. Chem. B.* 2006. V. 110. P. 18635–18640.
85. Quillin M.L., Anstrom D.M., Shu X., O’Leary S., Kallio K., Chudakov D.M., Remington S.J. // *Biochem.* 2005. V. 44. P. 5774–5787.
86. Grigorenko B.L., Nemukhin A.V., Topol I.A., Burt S.K. // *J. Phys. Chem. A.* 2002. V. 106. P. 10663–10672.
87. Nemukhin A.V., Grigorenko B.L., Topol I.A., Burt S.K. // *J. Comput. Chem.* 2003. V. 24. P. 1410–1420.
88. Wilmann P.G., Petersen J., Devenish R.J., Prescott M., Rossjohn J. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 2401–2404.
89. Chudakov D.M., Feofanov A.V., Mudrik N.N., Lukyanov S., Lukyanov K. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 7215–7219.
90. Schüttgrigkeit T.A., von Feilitzsch T., Kompa C.K., Lukyanov K.A., Savitsky A.P., Voityuk A.A., Michel-Beyerle M.E. // *Chem. Phys.* 2006. V. 323. P. 149–160.
91. Schäfer L.V., Groenhof G., Boggio-Pasqua M., Robb M.A., Grubmüller H. // *PLoS Comput. Biol.* 2008. V. 4. P. e1000034.
92. Vendrell O., Gelabert R., Moreno M., Lluch J.M. // *Chem. Phys. Lett.* 2004. V. 396. P. 202–207.
93. Vendrell O., Gelabert R., Moreno M., Lluch J.M. // *J. Am. Chem. Soc.* 2006. V. 128. P. 3564–3574.
94. Vendrell O., Gelabert R., Moreno M., Lluch J.M. // *J. Chem. Theor. Comput.* 2008. V. 4. P. 1138–1150.
95. Vendrell O., Gelabert R., Moreno M., Lluch J.M. // *J. Phys. Chem. B.* 2008. V. 112. P. 13443–13452.
96. Vendrell O., Gelabert R., Moreno M., Lluch J.M. // *J. Phys. Chem. B.* 2008. V. 112. P. 5500–5511.
97. Sinicropi A., Andruniow T., Ferre N., Basosi R., Olivucci M. // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. V. 127. P. 11534–11535.
98. Hasegawa J., Fujimoto K., Swerts B., Miyahara T., Nakatsuji H. // *J. Comput. Chem.* 2007. V. 28. P. 2443–2452.
99. Mochizuki Y., Nakano T., Amari S., Ishikawa T. // *Chem. Phys. Lett.* 2007. V. 433. P. 360–367.
100. Taguchi N., Mochizuki Y., Nakano T., Amari S., Fukuzawa K., Ishikawa T., Sakurai M., Tanaka S. // *J. Phys. Chem. B.* 2009. V. 113. P. 1153–1161.
101. Olsen S., Manohar L., Martinez T.J. // *Biophys. J.* 2002. V. 82. P. 359A–459A.
102. Wang S.F., Smith S.C. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2007. V. 9. P. 452–458.
103. Zhang H., Smith S.C. // *J. Theor. Comput. Chem.* 2007. V. 6. P. 789–802.
104. Lukyanov K.A., Chudakov D.M., Lukyanov S., Verkhusha V.V. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005. V. 6. P. 885–891.
105. Баскин И.И., Палюлин В.А., Зефиринов Н.С. // *Успехи химии.* 2009. Т. 78. С. 539–557.

УДК 577.218:616-006

# Новейшие подходы к лечению онкологических заболеваний: противоопухолевые препараты на основе ген-направленных нуклеиновых кислот

О.А. Патутина, Н.Л. Миронова, В.В. Власов, М.А. Зенкова\*

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. ак. Лаврентьева, 8

\*E-mail: marzen@niboch.nsc.ru

**РЕФЕРАТ** На сегодняшний день основным способом борьбы с онкологическими заболеваниями остается химиотерапия. Этот метод лечения находится на пике своих возможностей, поэтому кроме усовершенствования традиционных способов терапии неоплазий назрела настоятельная необходимость разработки новых подходов к лечению злокачественных заболеваний. В данном обзоре рассмотрены инновационные экспериментальные подходы к терапии злокачественных новообразований, основанные на применении ген-направленных препаратов, таких как антисмысловые олигонуклеотиды (asON), малые интерферирующие РНК (siРНК), рибозимы и ДНКазимы, способные ингибировать экспрессию онкогенов. Подробно охарактеризованы гены-мишени для таких препаратов и суммированы основные результаты преклинических и первые этапы клинических исследований в этом направлении. Показано, что ген-направленные олигонуклеотиды, в зависимости от выбранного гена-мишени, отличаются значительным разнообразием модулирующих эффектов на опухолевые ткани, начиная от замедления и остановки пролиферации опухолевых клеток и заканчивая подавлением их инвазивных свойств. Несмотря на общую природу, не все антисмысловые ген-направленные препараты, адресованные к одному и тому же участку последовательности мРНК гена-мишени, одинаково эффективны. Результат определяется сочетанием типа препарата и участка его комплементарности в последовательности мРНК для выбранного гена-мишени.

**Ключевые слова:** противоопухолевая терапия, антисмысловые олигонуклеотиды, рибозимы, ДНКазимы, малые интерферирующие РНК.

**Список сокращений:** asON – антисмысловые олигонуклеотиды, siРНК – малые интерферирующие РНК, РНКи – РНК интерференция.

## ВВЕДЕНИЕ

На современном этапе развития медицины приоритетной задачей практической онкологии является повышение эффективности лечения злокачественных новообразований путем поиска и разработки принципиально новых методических подходов, а также усовершенствования традиционных способов терапии неоплазий. Сочетание хирургии, радиационного облучения и химиотерапии остается золо-

тым стандартом лечения онкологических больных, успехи которого позволили увеличить выживаемость пациентов в 8 раз за последние 30 лет. Неудовлетворительные результаты только хирургического лечения проявляются в виде рецидивов опухоли, появления метастазов, а также возникновения неоперабельных форм злокачественных заболеваний. Это заставляет обращаться к применению радио- и химиотерапии. Однако даже комбинация мощных

противоопухолевых программ во многих случаях оказывается бездейственной. Поэтому, несмотря на безусловные достижения современной онкологии, проблема повышения эффективности методов воздействия на злокачественные новообразования является крайне важной.

За несколько последних десятилетий комплексная химиотерапия стала основным методом лечения пациентов, страдающих от злокачественных заболеваний. Однако ее применение, обеспечивая выживаемость от 30 до 90 % больных в зависимости от типа онкопатологии, ограничено рядом факторов: системной токсичностью, отсутствием селективности по отношению к опухолевым тканям и появлением лекарственно-устойчивых клонов опухолевых клеток.

Достижения последних лет обогатили науку детальными знаниями молекулярных процессов, лежащих в основе канцерогенеза, опухолевой инвазии, ангиогенеза и метастазирования, а также явлений, вовлеченных в супрессию опухоли, контроль роста, апоптоз и иммунный ответ. Для химиотерапии неоплазий эти знания позволили разработать целые поколения новых препаратов, таких как глевек (Gleevec, Glivec или Imatinib mesylate), мабтера (Mabthera или Rituximab) и т.п., обладающих высокоселективным воздействием на клеточную мишень. Известно, что создание любого нового препарата требует 10–20 лет исследований, а увеличение его селективности многократно повышает его стоимость. Сегодня химиотерапия – эта высокодозная активная атака на опухолевые клетки – находится на пределе своих возможностей. Несмотря на достигнутый уровень выживаемости пациентов (при некоторых нозологических формах он увеличился за последние 20 лет в 10 раз) остается еще от 10 до 70 % больных, которые в силу разных факторов не реагируют на лечение. Таким образом, создание новых средств является актуальной задачей сегодняшнего и завтрашних дней. Среди различных классов разрабатываемых лекарственных средств для лечения онкопатологий особое место занимают ген-направленные препараты. Впервые возможность ингибирования экспрессии гена была показана в пионерских работах Гринёвой Н.И. с соавторами [1–3] и получила свое дальнейшее развитие в рамках идеи регуляции экспрессии генов, вовлеченных в канцерогенез, под действием антисмысловых [4] и ген-направленных олигонуклеотидов [5]. Сегодня основные течения ген-направленной терапии злокачественных заболеваний включают стратегии подавления гиперэкспрессии онкогенов, восстановления экспрессии генов-супрессоров опухолей, потенцирования активности иммунной системы, подавления процессов ангиогенеза и метастазирования, запуска самодеструкции опухоли.

В данном обзоре рассмотрены современные экспериментальные подходы к лечению онкологических заболеваний, основанные на использовании ген-направленных олигонуклеотидов, которые исследуются в настоящее время в экспериментах на клетках и на лабораторных животных, некоторые из них проходят различные стадии клинических испытаний.

### ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ ГЕН-НАПРАВЛЕННЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Противоопухолевые препараты на основе нуклеиновых кислот представляют собой высокоспецифичный инструмент модуляции экспрессии генов и давно привлекают

внимание исследователей в качестве регуляторов канцерогенеза на молекулярном уровне. Подавление ряда генов, аномально высокая экспрессия которых возникает при неопластической трансформации, можно осуществить с помощью препаратов на основе нуклеиновых кислот, таких как антисмысловые олигонуклеотиды (asON), малые интерферирующие РНК (siРНК), рибозимы и дезоксирибозимы. В общем, механизм подавления экспрессии генов под действием этих препаратов заключается в их комплементарном связывании с мРНК-мишенью, после чего целевая мРНК либо подвергается расщеплению, либо блокируется процесс ее трансляции.

asON представляют собой синтетические одноцепочечные ДНК длиной 15–20 нуклеотидов, которые способны формировать комплементарный комплекс с целевой последовательностью мРНК [6]. Подавление биосинтеза белка под действием asON происходит либо вследствие того, что мРНК-мишень в составе гибридного ДНК/РНК комплекса с asON расщепляется внутриклеточной РНКазой Н (рис. 1а), либо вследствие блокирования трансляции, так как образование гибридного комплекса препятствует продвижению рибосомы по мРНК (рис. 1б) [7]. В последнее время были получены asON, способные препятствовать транспорту сплайсированной мРНК из ядра в цитоплазму, а также asON, которые в результате блокирования сайта сплайсинга в пре-мРНК способны приводить к экспрессии альтернативного варианта белка [8, 9].

Впервые возможность избирательного подавления продукции определенного белка под действием asON была продемонстрирована в работе Замечника и Стефенсона в 1978 г. [4], в которой они показали, что 13-звенный олигонуклеотид, комплементарный 3'-концевой последовательности РНК вируса саркомы Рауса, ингибирует репликацию вируса *in vitro*. Эта работа послужила толчком к изучению потенциала asON в качестве терапевтических средств для лечения онкологических и вирусных заболеваний, воспалительных процессов, болезней крови, расстройств сердечно-сосудистой системы [10–14].

Ввиду того, что природные олигодезоксирибонуклеотиды в культуре клеток и в условиях *in vivo* подвергаются быстрой деградации под действием нуклеаз,

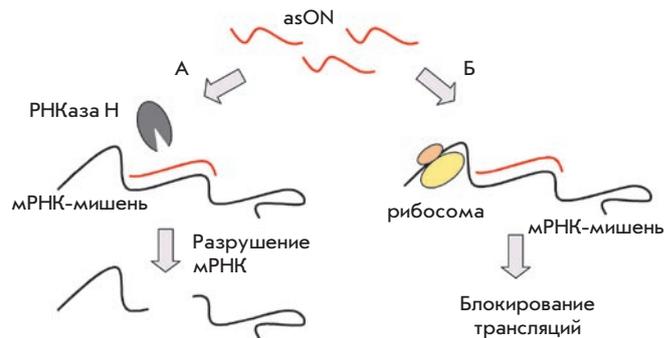


Рис. 1. Механизмы действия антисмысловых олигонуклеотидов (asON): а – расщепление РНК в составе гетеродуплекса с asON РНКазой Н; б – блокирование трансляции за счет связывания олигонуклеотида с мРНК

для повышения их стабильности в структуру asON вводят различные химические модификации [11]. Введение модификаций в структуру олигонуклеотида не только приводит к повышению устойчивости asON к нуклеазам, но и увеличивает эффективность его биологического действия, улучшает его гибридационные свойства и облегчает его захват клетками. Среди наиболее значимых производных антисмысловых олигонуклеотидов необходимо упомянуть тиофосфатные олигонуклеотиды, у которых один из атомов кислорода, не участвующий в формировании фосфодиэфирной связи, заменен на атом серы [11, 15]. Тиофосфатные asON обладают повышенной устойчивостью к действию нуклеаз, хорошей растворимостью, хорошими гибридационными свойствами и образуют с мРНК гетеродуплекс, который является субстратом РНКазы H [11]. Недостатком тиофосфатных asON является их повышенное сродство к ряду белков [16, 17]. Второе поколение asON содержало алкильные заместители в 2'-положении рибозы: 2'-О-метильные и 2'-О-метоксиэтильные олигорибонуклеотиды эффективно блокировали трансляцию мРНК, но не активировали расщепление гетеродуплекса мРНК/asON РНКазой H [18]. Позднее Нильсен с соавторами заменили сахарофосфатный остов нуклеиновой кислоты на N-(2'-аминоэтил)-глицин полиамидную структуру [19], что дало начало пептидил-нуклеиновым кислотам (PNA). PNA обладают высокой биологической стабильностью и хорошими гибридационными свойствами, однако они не активируют РНКазу H. Кроме того, PNA являются нейтральными молекулами, что создает определенные трудности при их растворении и проникновении в клетки [20, 21]. К asON третьего поколения, кроме PNA, относятся N3'-N5'-фосфоамидаты (NP), в которых в 2'-дезоксирибозе 3'-гидроксильная группа заменена на 3'-аминогруппу [22] и морфолино-олигонуклеотиды (MF), основу скелета в которых составляют морфолин и диметиламидофосфитный линкер [23]. Молекулярный механизм действия этих олигонуклеотидов заключается в блокировании трансляции за счет связывания asON с целевой мРНК и/или модуляции сплайсинга [23]. NP и MF олигонуклеотиды применяют преимущественно для изучения биологии развития на эмбрионах полосатых данио (*danio rerio*, или zebra-fish) [24].

Одними из наиболее многообещающих химически модифицированных аналогов олигонуклеотидов являются LNA (Locked Nucleic Acids) – олигонуклеотиды, содержащие дополнительный структурный элемент – 2'-О,4'-С-метиленовый мостик, фиксирующий сахарный остаток в С3'-эндо-конформации [25, 26]. LNA проявляют стабильность к нуклеазному расщеплению и обладают исключительно высоким сродством к нуклеиновым кислотам. Перспективность использования LNA *in vivo* подтверждается тем, что они отличаются чрезвычайно низкой токсичностью при внутривенном введении, а также при микроинъекциях в мозг животных [27].

Явление РНК интерференции (РНКи) впервые было открыто у червя *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) как биологический ответ на экзогенную двуцепочную РНК (дцРНК), которая индуцировала специфическое подавление экспрессии гена (gene silencing) [28]. РНКи представляет со-

бой эволюционно консервативный механизм, благодаря которому организм способен защитить себя от внедрения чужеродной РНК, например вирусной [29, 30]. Экзогенная дцРНК при попадании в организм процессируется в малые интерферирующие РНК (siРНК – small interfering RNA) под действием внутриклеточной рибонуклеазы Dicer [31]. Эти siРНК длиной 21–22 нуклеотида затем включаются в мультибелковый комплекс RISC (RNA-induced silencing complex). siРНК в составе комплекса RISC специфически связываются с комплементарной последовательностью мРНК, после чего происходит расщепление мРНК с помощью внутриклеточной рибонуклеазы Argonaute 2, входящей в комплекс RISC (рис. 2) [30, 32]. Далее молекулы siРНК повторно используются комплексом RISC для разрушения следующей молекулы гомологичной им мРНК, обеспечивая тем самым высокоэффективное ингибирование экспрессии гена [32]. Специфическое подавление экспрессии гена может быть достигнуто с помощью химически синтезированных siРНК или siРНК, полученных ферментативно *in vitro*, а также с помощью коротких шпилечных РНК – shРНК (short hairpin RNA), экспрессирующихся

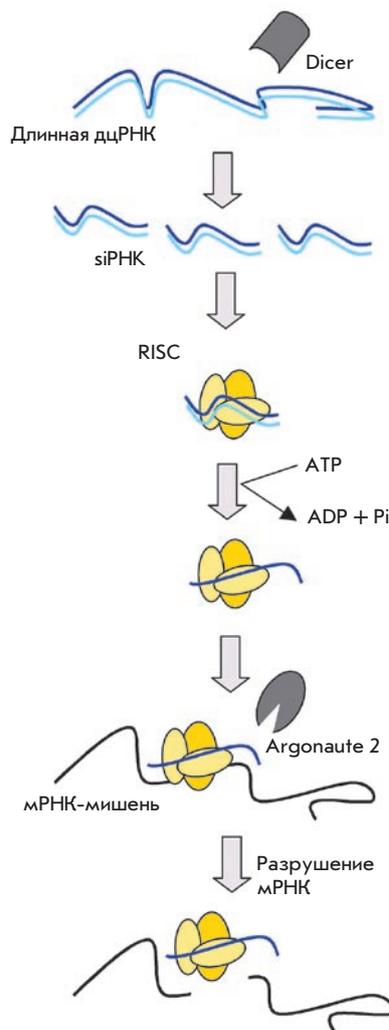


Рис. 2. Механизм РНК-интерференции

в клетке с ДНК матриц, которые могут быть получены с помощью ПЦР или включены в состав ДНК векторов [33].

В 80-х годах прошлого столетия были обнаружены каталитические молекулы РНК, способные расщеплять РНК, – рибозимы [34]. Существующие в природе каталитические РНК исследователи делят на большие и малые рибозимы. Большие рибозимы включают РНК, кодирующие интроны I и II групп, а также РНК субъединицы РНКазы Р. Малые рибозимы включают рибозимы типа «головки молотка», шпильчатые рибозимы, рибозимы вируса гепатита D и рибозимы сателлитной РНК Варкуда (Varkud Satellite RNA) [35, 36]. Расщепление РНК рибозимами протекает в 3 этапа: связывание рибозима с комплементарной последовательностью РНК путем формирования классических Уотсон–Криковских пар оснований, сайт-специфичное расщепление РНК-субстрата и высвобождение продуктов расщепления (рис. 3а) [36].

Практически все типы рибозимов проходят исследование в качестве терапевтических препаратов, однако рибозимы типа «головки молотка» применяются более широко благодаря их большей изученности [35]. Этот рибозим расщепляет РНК-мишень преимущественно по триплету NUN (N – любой нуклеотид; Н – любой нуклеотид, кроме гуанозина), причем последовательности AUC и GUC процессируются наиболее эффективно [37]. Другим часто применяемым в терапевтических исследованиях рибозимом является рибозим в форме шпильки [38]. Рибозим в форме шпильки расщепляет РНК-субстрат по последовательности N\*GUC (N – любой нуклеотид).

Природные молекулы ДНК, обладающие ферментативной активностью, в отличие от рибозимов, в природе обнаружены не были. В 1997 году Санторо и Джойс, используя метод селекции *in vitro* (SELEX), получили олигодезоксирибонуклеотиды, способные катализировать расщепление РНК. Эти молекулы были названы дезоксирибозимами или «10–23» ДНКазимами [39]. «10–23» ДНКазимы представляют собой одноцепочечные молекулы ДНК, в состав которых входит консервативный каталитический кор длиной в 15 нуклеотидов, фланкированный двумя вариабельными последовательностями олигодезоксирибонуклеотидов, отвечающих за образование комплементарного комплекса с РНК-мишенью (рис. 3б) [39]. Расщепление молекулы РНК происходит между неспаренным пурином и спаренным пиримидином в присутствии ионов магния, при этом наиболее эффективное расщепление происходит по AU и GU сайтам.

### ГЕНЫ-МИШЕНИ ДЛЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ГЕН-НАПРАВЛЕННЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Ключевую роль в онкогенезе играют изменения уровней активности определенных генов, аномальная экспрессия которых приводит к нарушениям регуляции клеточной пролиферации, апоптоза, дифференцировки, инвазии [40]. На молекулярном уровне процесс злокачественной трансформации представляет собой сложный каскад реакций, поэтому деятельность онкогенов зачастую многофункциональна и тесно взаимосвязана [40]. Являясь транскрипционными факторами и компонентами системы передачи сигналов в клетке, они вовлечены в целый ряд регуляторных путей, начиная от пролиферации клеток и ингибирования апоптоза и заканчивая инвазией. Основные гены-мишени для ген-направленной терапии представлены в табл. 1.

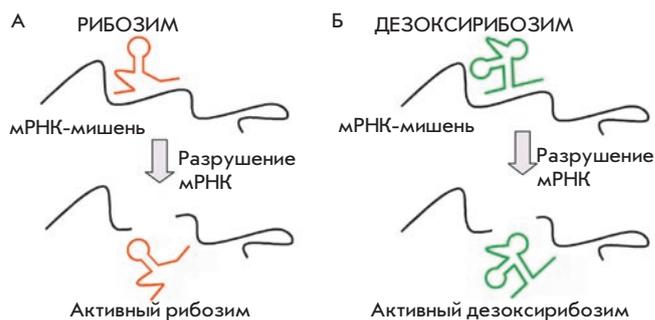


Рис. 3. Механизм действия рибозимов (а) и ДНКазимов (б)

Прежде всего, злокачественный рост клеток основан на автономной и неограниченной пролиферации клеточного клона. Поэтому исследователей в первую очередь привлекают гены, контролирующие пролиферацию и смену фаз клеточного цикла, такие как *c-myc*, *ras*, гены, кодирующие протеинкиназу С-α (PKC-α – protein kinase C-α), рецептор инсулин-подобного фактора роста-1 (IGF-1R – insulin growth factor-1 receptor). Воздействие на системы программируемой гибели клеток путем ингибирования экспрессии антиапоптотических генов, таких как *bcl-2*, *survivin* и других, представляется также чрезвычайно эффективным.

Белки семейства Ras (K-ras, H-ras и N-ras) являются одними из самых изученных молекул, осуществляющих передачу сигнала от тирозинкиназных рецепторов в ядро клетки [41]. В результате гиперэкспрессии или точечной мутации гена *ras*, обнаруженной во многих типах онкологических заболеваний, белок Ras утрачивает способность дефосфорилироваться и, таким образом, постоянно находится в активированном состоянии, имитируя и передавая сигналы, стимулирующие пролиферацию и поддерживающие выживаемость опухолевых клеток [42]. Гены представителей семейства Ras являются привлекательными мишенями для применения ген-направленной ингибирующей терапии. Любопытной чертой ингибирующего действия рибозимов на активность онкогена *ras* является повышение степени дифференцированности опухолевых клеток [43–47]. Однако лидирующую позицию среди ген-направленных препаратов, подавляющих экспрессию онкогена *ras*, занял asON ISIS 2503. В 2004 году были объявлены результаты фазы II клинических испытаний совместного применения asON ISIS 2503 и гемцитабина [48].

Важная роль онкогена *c-myc* в регуляции пролиферации клеток и их злокачественного перерождения была установлена в конце 70-х годов Бишопом [49], и в качестве мишени для антисмысловой терапии этот белок один из первых привлек внимание исследователей. Доминирующую позицию среди ген-направленных препаратов, разработанных для регуляции экспрессии гена *c-myc*, занял морфолино-олигонуклеотид asON AVI-4126, подавляющий синтез белка не за счет активации РНКазы H, а за счет стерического блокирования трансляции [50]. Этот препарат успешно прошел преclinical испытания, продемонстрировал хорошую переносимость у паци-

Таблица 1. Характеристика генов-мишеней для препаратов на основе ген-направленных нуклеиновых кислот

События канцерогенеза	Гены-мишени	Функции	Препараты, применяемые для подавления функции
Пролиферация	Онкогены <i>ras</i> ( <i>K-ras</i> , <i>H-ras</i> и <i>N-ras</i> )	Участие в системе передачи сигналов в клетке, регуляция широкого спектра деятельности клетки, включая пролиферацию, дифференцировку и выживаемость [42]	asON, рибозимы, siРНК
	<i>c-myc</i>	Активация пролиферации опухолевых клеток (регуляция клеточного цикла и активности теломеразы) [49,160]	asON, siРНК, ДНКазимы
	РКС-α	Участие в клеточной системе передачи сигналов, контроль пролиферации и выживаемости клеток [53,54]	asON, рибозимы, ДНКазимы
	Кластерин	Участие в транспорте липидов, делении клеток, апоптозе, поддержание выживаемости клеток в ответ на лечение и повышение резистентности опухолей [57,58]	asON
	IGF-1R	Активация сигнальных путей MAPK и PI-3K, стимулирующих пролиферацию/митогенез и ингибирование апоптоза [61–63]	asON
Блокировка апоптоза	<i>bcl-2</i>	Негативная регуляция апоптоза за счет блокирования выхода в цитоплазму цитохрома с из митохондрий [67]	asON, siРНК, рибозимы
	Сурвивин	Регуляция клеточного деления (взаимодействие с трубками веретена деления способствует переходу клеток в сверхной точке G <sub>2</sub> /M в состояние митоза), подавление апоптоза (ингибирование внутреннего каспаза-9-зависимого пути апоптоза) [73,74]	asON, рибозимы
	<i>bcr-abl</i>	Стимуляция митогенного и антиапоптотического сигналов, опосредуемых Ras-регулируемыми сигнальными путями [81,82]	Рибозимы, ДНКазимы, siРНК
	<i>c-raf</i>	Активация каскада MAPK/ERK, негативная регуляция апоптоза посредством инактивации проапоптотического белка Bad [88,90]	asON
Лекарственная устойчивость	MDR1	Формирование трансмембранных каналов для АТФ-зависимого выкачивания лекарственных средств из клетки, обеспечение резистентности опухоли [95–97]	asON, siРНК, рибозимы
	γ-глутамилцистеин синтетазы (система глутатиона)	Внутриклеточная детоксикация противоопухолевых препаратов [95]	Рибозимы
Дисфункция генов-супрессоров опухоли	DNMT1	Гиперметилирование и инактивация генов-супрессоров опухолей [102, 103]	asON
Увеличение продолжительности жизни опухолевых клеток	hTERT	Гиперактивация механизма удлинения теломерного повтора и, как следствие, увеличение продолжительности жизни малигнизированных клеток и их злокачественности [109]	asON, рибозимы
Арест синтеза ДНК	<i>RRR2</i> или <i>RRM2</i>	Регулирование содержания в клетках дезоксирибонуклеотидов, необходимых для синтеза ДНК за счет трансформирования рибонуклеотидов в дезоксирибонуклеотиды [113]	asON, siРНК
Ангиогенез опухоли	<i>Flt-1</i> (VEGFR)	Активная неоваскуляризация, подавление противоопухолевого иммунного ответа [119, 120]	asON, рибозимы, ДНКазимы, siРНК
	<i>neu</i> (HER2 или ErbB2, семейство EGFR)	Активация сигнальных путей, приводящих к стимуляции событий опухолевой прогрессии: пролиферации, инвазии и ингибированию апоптоза [127,128]	asON, рибозимы
	eIF4E	Усиление трансляции ростовых факторов, например, таких, как VEGF, C-мус, сурвивин и других [133–135]	asON
	PTN	Являясь фактором роста, способствует активному росту опухолей и их васкуляризации [137–139]	Рибозимы
	ALK	Являясь рецептором тирозинкиназы для PTN, способствует его активной работе и, следовательно, усилению васкуляризации опухолей [141]	»
Инвазия опухоли	MMP9	Элиминирование компонентов внеклеточной мембраны, облегчение инвазии опухолей [144–146]	Рибозимы, siРНК
	Ген FGF-BP	Активация FGF-2, индуцирующего пролиферацию опухолевых клеток и усиление инвазивного и ангиогенного потенциала [148]	Рибозимы
	Egr-1	Активация пролиферации и инвазии опухолей, участие в формировании фенотипа МЛУ [154,155]	ДНКазимы
	ФАК	Регуляция адгезии и инвазии во внеклеточный матрикс [158]	siРНК
	CXCR4	Стимуляция процессов метастазирования [159]	»

ентов и сейчас находится в фазе II клинических исследований [51, 52].

Семейство генов протеинкиназы С представляет собой семейство серин-треониновых киназ, которые вовлечены в регуляцию важнейших функций клетки, включая дифференцировку, межклеточные взаимодействия, секрецию, функционирование цитоскелета, транскрипцию генов, пролиферацию и апоптоз [53]. Среди десятка изоформ белков этого семейства лишь РКС- $\alpha$  имеет связь с выживаемостью клеток, пролиферацией и апоптозом [54], принимая активное участие в неопластической трансформации клеток. Наилучшим кандидатом для избирательного подавления экспрессии гена опухолеспецифичной изоформы РКС- $\alpha$  оказался тиофосфатный asON ISIS 3521 (Affinitak™, США), селективно связывающийся с мРНК РКС- $\alpha$  и не проявляющий специфичности в отношении генов других неонкогенных представителей семейства протеинкиназ [55]. Этот препарат был разрешен для проведения клинических испытаний.

Кластерин впервые был описан в 1983 году как секреторный гликопротеин [56], ассоциированный с широким спектром физиологических и патологических процессов, таких как транспорт липидов, тканевая трансформация, защита клеточной мембраны, апоптоз и участие в системе комплемента [57]. Более поздние наблюдения показали, что кластерин представляет собой шапероноподобный белок и в ответ на стресс способствует выживаемости клеток [58]. Инактивация этого гена под действием ген-направленных препаратов может ослаблять механизмы репарации клетки в ответ на внешние губительные воздействия, такие как химиотерапия. Действительно, asON OXG-011 двукратно увеличивал токсическое действие паклитакселя на опухолевые клетки у мышей [59], а сейчас активно тестируется в клинических испытаниях в сочетании с химиопрепаратами [60].

Рецептор ростового инсулин-подобного фактора-1 (IGF-1R – insulin growth factor-1 receptor) представляет собой трансмембранную протеинкиназу, которая поддерживает независимый рост клеток [61]. Аномалия в экспрессии гена *IGF-1R* тесно связана с канцерогенезом [61]. Было показано, что гиперэкспрессия гена *IGF-1R* способствует развитию MDR1- и Bcl-2-опосредованной множественной лекарственной устойчивости МЛУ [61, 63]. Снижение экспрессии гена *IGF-1R* под действием ген-направленного антисмыслового олигонуклеотида препятствует развитию опухолей у мышей в экспериментах *ex vivo* [64], что подтверждает перспективность применения asON для устранения защитной системы опухолевых клеток.

Белок Bcl-2 является основополагающим представителем семейства про-(Bax, Bak, Bad) и анти-(Bcl-xl, Mcl-1) апоптотических факторов и был впервые обнаружен в клетках В-клеточной лимфомы в 1985 году [65]. Экспрессия гена *bcl-2* ассоциирована с агрессивным поведением опухолей в ответ на лечение химиопрепаратами и облучением [66]. Избыточный белок Bcl-2 способствует ингибированию деполаризации митохондриальной мембраны, блокируя тем самым механизмы апоптоза, запускаемые в ответ на лечение [67]. Снижение экспрессии гена *bcl-2* под действием ген-направленных олигонуклеотидов как напрямую

способствовало запуску апоптоза в опухолевых клетках, так и увеличивало чувствительность клеток к апоптоз-индуцирующим химиопрепаратам [68, 69]. asON G3139 продемонстрировал значительный терапевтический успех, он находится в фазе III клинических испытаний [70–72].

Сурвивин является представителем семейства ингибиторов апоптоза (IAP). Несмотря на то что его функция в клетке до сих пор остается неопределенной, было установлено, что этот белок вовлечен в регуляцию клеточного деления и апоптоз [73]. Сурвивин селективно ингибирует внутренний каспаза-9-зависимый путь апоптоза [74], а в результате взаимодействия с микротрубочками веретена деления в обход механизмов апоптоза способствует переходу клетки в сверхочной точке  $G_2/M$  в состояние митоза [75], стимулируя аномальную прогрессию роста клеток. Снижение экспрессии гена сурвивина под действием asON напрямую приводило к индукции апоптоза и гибели опухолевых клеток [76, 77], ингибирующее же действие рибозима на активность гена без привлечения дополнительных индукторов апоптоза не влияло на жизнеспособность клеток [78–80]. Изучение сурвивина в качестве гена-мишени в экспериментах *in vivo* пока не проводилось.

Хромосомная транслокация t(9;22) объединяет два независимых гена – *bcr*, локализованный в хромосоме 22, и *abl*, расположенный в хромосоме 9 человека, – с образованием гибридного онкогена [81]. Так же как и исходный ген *abl*, образовавшийся химерный ген *bcr-abl* обладает повышенной киназной активностью. Путем фосфорилирования определенных клеточных факторов *bcr-abl* способствует злокачественному преобразованию клеток и отмене апоптоза [82]. В частности, образование гена *bcr-abl* приводит к развитию миелоидной или лимфоидной лейкемии [83]. Гибридная природа белка создала некоторые трудности для воздействия на его экспрессию: в некоторых случаях ген-направленные препараты вызывали подавление экспрессии не только химерного гена *bcr-abl*, но и исходного *abl* [84]. Эффективно избежать неспецифичности воздействия позволил максизим, двойной рибозим, осуществляющий расщепление РНК-мишени по двум сайтам [85]. Для подавления развития хронического миелолейкоза был разработан препарат иматиниб, обеспечивающий селективное ингибирование тирозинкиназы и позволяющий эффективно контролировать развитие лейкемии [86]. Однако встречаются случаи заболевания, проявляющие резистентность к иматинибу, вследствие образования точечных мутаций в гене или в силу каких-то других причин. В этих случаях на помощь приходит технология РНКи. Эксперименты с применением siРНК показали, что восприимчивость *bcr-abl*<sup>+</sup> клеток к действию иматиниба можно восстановить с помощью РНКи [87].

Белки семейства Raf представляют собой серин-треониновые киназы, которые передают сигналы от широкого спектра мембранных рецепторов факторов роста к регуляторам апоптоза. Было установлено, что функционально активный белок Raf-1 активирует каскад MAPK/ERK (mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinases) [88], посредством NF- $\kappa$ B участвует в сигнальных путях регуляции пролиферации и выживаемости клетки [89], ингибирует проапоптотический белок Bad [90].

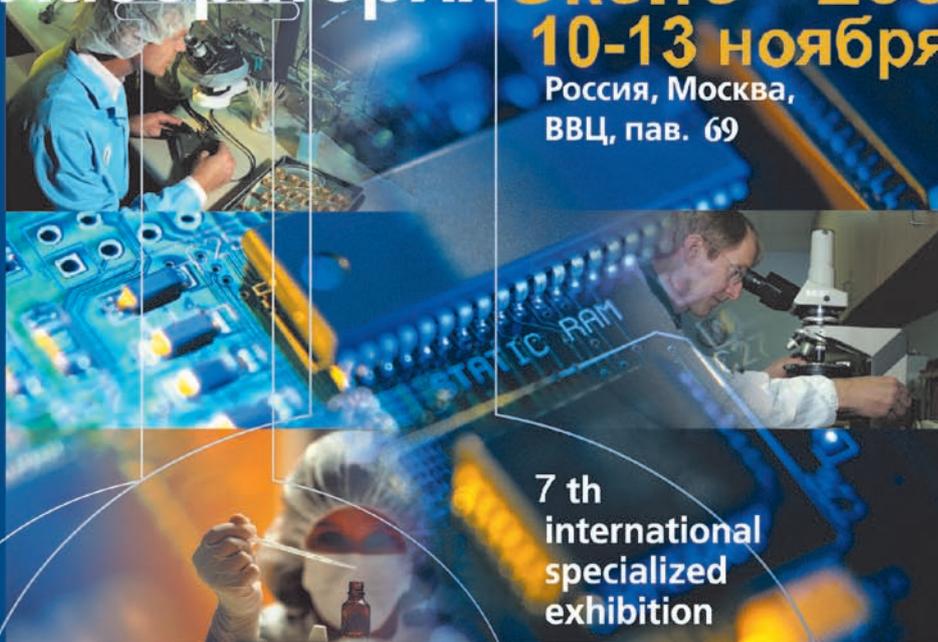


7-я  
международная  
специализированная  
выставка

# Лаборатория Экспо - 2009

10-13 ноября

Россия, Москва,  
ВВЦ, пав. 69



7 th  
international  
specialized  
exhibition

# Laboratory Expo - 2009

November, 10-13

Pav. 69, All-Russian  
Exhibition center,  
Moscow, Russia

#### ОРГАНИЗАТОРЫ:

- Федеральное агентство по техническому регулированию и метрологии
- Русская выставочная компания «Эксподизайн» при поддержке:  
Федеральных министерств и ведомств, РАН, РАМН, Ассоциации аналитических центров «Аналитика»

#### РАЗДЕЛЫ ВЫСТАВКИ:

- аналитическое и контрольно-измерительное оборудование, инструменты и химреактивы
- метрология
- центры коллективного пользования: оснащение и перспективы
- оборудование для механических испытаний, измерений твердости, испытаний на коррозионную стойкость
- оборудование для неразрушающего контроля
- оборудование электролабораторий
- лабораторная мебель, посуда, спецодежда
- инвестиционные проекты.

#### МЕРОПРИЯТИЯ,

#### ПРОВОДИМЫЕ В РАМКАХ ВЫСТАВКИ:

- Научно - практический форум «Современная лаборатория»: конференции, семинары, круглые столы.
- Конкурс: «Лучшее лабораторное оборудование, изделие, прибор»
- Награды: Медаль и Диплом выставки «Лаборатория Экспо - 2009», Медаль и Диплом ВВЦ, «Знак качества» лабораторного оборудования, изделия, прибора.



РОССИЙСКОЕ ВЫСТАВОЧНОЕ ОБЩЕСТВО  
ЭКСПОДИЗАЙН

#### ДИРЕКЦИЯ ВЫСТАВКИ:

Тел./факс: (495) 926 - 80-63,  
258-87-62, (499) 181-60-83  
E-mail: lab@expo-design.ru  
Http://www.expo-design.info

Таким образом, белок Raf-1 находится в центре важнейших сигнальных сетей клетки, и мутации или нарушения экспрессии гена *raf-1* играют существенную онкогенную роль при перерождении клеток. Кроме того, белок Raf-1 является эффектором белкового продукта онкогена *ras* [91], мутации которого с высокой частотой возникают при злокачественной трансформации, поэтому терапия, направленная на подавление гена *raf-1*, может оказаться эффективной и при лечении *ras*-опосредованных неоплазий. Наиболее обещающие результаты специфического подавления гена *c-raf* и связанный с этим противоопухолевый эффект были получены при использовании асОН. В 2002 году исследователи сообщили о результатах фазы II клинических испытаний препарата на основе тиофосфатного асОН [92–94].

Как правило, при традиционной химиотерапии более чем у 30 % больных развивается лекарственная устойчивость, вызванная гиперэкспрессией гена множественной лекарственной устойчивости *MDR1* [95–97], кодирующего белок Р-гликопротеин. Р-гликопротеин принадлежит к суперсемейству АВС-транспортёров, использующих энергию гидролиза АТФ для осуществления выкачивания химиопрепаратов из клетки. Гиперактивность Р-гликопротеина определяет устойчивость опухолевых клеток к широкому спектру химиопрепаратов. Поэтому инактивация гена *MDR1* может способствовать накоплению химиопрепарата в клетках и их гибели. Ген *MDR1* является достаточно распространённой мишенью для ген-направленных препаратов олигонуклеотидов, из которых наиболее эффективными на сегодняшний день кажутся рибозимы и siРНК. Эти препараты практически полностью подавляли рост опухолей у мышей [98, 99].

Одной из важнейших систем клетки, позволяющей ей обезвреживать цитостатики, является система глутатиона. Глутатион представляет собой небелковый тиол, взаимодействие сульфгидрильной группы которого с реактивной группой лекарственного средства определяет образование конъюгатов препарата с глутамином [95]. Эти конъюгаты менее активны, более водорастворимы и выбрасываются из клетки с помощью белков транспортёров [95]. Поэтому активация генов системы глутатиона может определять резистентность клеток к лекарствам [100]. Для преодоления МЛУ, опосредованной системой глутатиона, был разработан рибозим, который эффективно восстанавливал чувствительность опухолевых клеток к химиопрепаратам [101].

Множественные исследования показали возникновение в раковых клетках нарушенного метилирования некоторых районов генома [102]. Фермент ДНК-метилтрансфераза (*DNMT1* – DNA methyltransferase 1) катализирует перенос метильной группы от S-аденозилметионина по 5 положению остатков цитозина в CpG островках, влияя тем самым на экспрессию генов [103]. Было установлено, что в опухолевых клетках возрастает активность ДНК-метилтрансферазы [104], а инициация гиперактивности этого фермента приводит к злокачественной трансформации [105]. Кроме того, утверждается, что аномалия в процессах метилирования является важным фактором в определении ответа опухоли на химиотерапию [106]. В результате антисенс-ингибирования экспрессии гена *DNMT1* восстанавливалась функция генов-супрессоров опухолей

и увеличивалась гибель опухолевых клеток [107]. Разработанный антисмысловый олигонуклеотид MG98 сейчас находится в фазе II клинических испытаний [108].

Теломеразная обратная транскриптаза восстанавливает длину теломеров за счёт добавления tandemных повторов (TTAGGG) и необходима для полной репликации концов хромосом [109]. Установлено, что гиперактивация теломеразной обратной транскриптазы человека (*hTERT* – human telomerase reverse transcriptase) и канцерогенез тесно взаимосвязаны [110]. Для подавления активности гена фермента были разработаны асОН, содержащие различные модификации, включая 2'-О-метильный асОН, PNA [111] и 2'5'-олигоаденилат олигонуклеотид [112]. 2'-О-метильный асОН подавлял экспрессию гена *hTERT* в культуре клеток на 97 % [111], а 2'5'-олигоаденилат олигонуклеотид вызывал 50 %-ную регрессию опухоли [112].

Фермент рибонуклеотидредуктазы катализирует синтез 2'-деоксирибонуклеотидов из соответствующих рибонуклеозид 5'-дифосфатов. Этот этап является лимитирующим скоростью реакции образования 2'-деоксирибонуклеозид-5'-трифосфатов, необходимых для синтеза ДНК [113]. R2 субъединица рибонуклеотидредуктазы (*RRR2*) экспрессируется в период поздней G<sub>1</sub> и ранней S фазы и играет существенную роль в определении скорости репликации ДНК [113]. Кроме того, известно, что *RRR2* играет важную роль в определении злокачественного потенциала клеток посредством синергизма с некоторыми онкогенами и связи с мембраносвязывающим белком Raf-1 и митоген-ассоциированной протеинкиназой-2 [114, 115]. Поэтому специфическое ингибирование мРНК *RRR2* может оказать антинеопластический эффект через целый ряд механизмов. Применение асОН GTI-2040 для подавления экспрессии *RRR2* приводило к 98 %-ной регрессии трансплантированной мышам карциномы почек [116]. В клинических испытаниях этот препарат продемонстрировал хорошую переносимость пациентами [117].

В начале 70-х годов Фолькман предположил, что рост солидных опухолей и метастазирование критическим образом зависят от ангиогенеза – формирования новых кровеносных сосудов из окружающей сосудистой сети [118]. Патологический рост новых сосудов обуславливает дальнейшую прогрессию солидных опухолей и их метастазирование. В течение нескольких последних десятилетий были обнаружены и охарактеризованы основные медиаторы ангиогенеза, обеспечив исследователей новыми онкомешинами. Среди многих стимуляторов неоангиогенеза наиболее мощным является фактор роста эндотелия сосудов (*VEGF* – vascular endothelial growth factor) [119]. Путём активации рецепторов *VEGFR-1* и *VEGFR-2* *VEGF* индуцирует активность внеклеточных сигнальных тирозинкиназ, играющих центральную роль в стимуляции пролиферации эндотелиальных клеток [120]. В результате альтернативного сплайсинга образуется как минимум 5 изоформ *VEGF*: *VEGF*<sub>206</sub>, *VEGF*<sub>189</sub>, *VEGF*<sub>165</sub>, *VEGF*<sub>145</sub>, *VEGF*<sub>121</sub> [121, 122]. Установлено, что усиленный ангиогенез и прогрессия опухолей ассоциированы с гиперэкспрессией изоформы *VEGF*<sub>165</sub> [123]. Для ингибирования активности *VEGF* были разработаны олигонуклеотиды и siРНК, специфически подавляющие экспрессию гена ростового фактора [124, 125]. Интересным подходом ингибирования активности *VEGF*

## Главная тема

### [Атомно-оптическая нанолитография](#)

Читайте обзор всех методов атомной нанолитографии и перспектив их применения в журнале «Российские нанотехнологии» № 7-8 2009

[читать полностью](#)

### [У истоков российских нанотехнологий](#)

Непосредственные участники научных исследований рассказывают как все было на самом деле

[читать полностью](#)

### [Сценарии научно-технологического развития России](#)

Бурное развитие пакета информационных технологий в конце XX-начале XXI века обеспечило формирование рынков классического инвестиционного типа и поддерживало существующую послевоенную финансовую систему в течение нескольких десятилетий. Это позволило развить возможности управления и получить важнейший инструмент для регулирования кризисных ситуаций. Совершенно очевидно, что для пролонгации действия классического финансово-кредитного механизма требовалось открытие новых рыночных ниш.

[читать полностью](#)

## Новости

### Новость дня:



## Наноарт - увидеть невидимое

Изображения вещества, полученные с помощью электронных и атомно-силовых микроскопов, являются объектом наноарта — нового направления в искусстве. Правда, чтобы цифровой «отпечаток» произведения искусства, надо лишь немного приукрасить реальность.



### 31.08.2009 [Наночастицы](#)

О свойствах и применении высокодисперсных наночастиц в статье на конференции "Лондонские нанотехнологии"

Фото: [Oberazzi](#)



### 27.08.2009 [Быстро и безопасно](#)

Впервые в России будет развернут экспериментальный проект «brachios» — короткий, быстрый и безопасный способ производства наночастиц, который не требует использования радиоактивных изотопов

Фото: [greenleaves](#)



### 27.08.2009 [В РОСНАНО](#)

Генеральная прокуратура по поручению Президента РФ проводит проверку деятельности пяти госкорпораций

Фото: [gregwake](#)

новости и события  
конференции  
интервью  
нанотехнологии  
образование

экономика  
научные коллективы  
репортажи  
мнения экспертов  
лекции и семинары

стала разработка рибозимов, а позднее и ДНКазимов, направленных на подавление экспрессии рецепторов VEGF VEGFR-1, кодируемого геном *Flt-1*, и VEGFR-2, кодируемого геном *KDR* [126]. Среди всех предложенных стратегий подавления активности VEGF этот подход оказался наиболее эффективным, и препарат на основе рибозима ангиозим, направленный на подавление экспрессии гена *Flt-1*, достиг фазы II клинических испытаний [35].

Протоонкоген *neu*, также известный как *HER-2/erbB-2* или *NGL*, кодирует трансмембранный рецептор, обладающий высокой тирозинкиназной активностью, важной для внутриклеточной передачи сигналов [127]. В норме белок HER-2 не экспрессируется в большинстве тканей человека, а при неоплазиях этот рецептор проявляет тирозинкиназную активность даже в отсутствии лиганда [128]. Гиперэкспрессия HER-2 при онкогенезе часто связывают с амплификацией гена [129]. Недавно на основе моноклональных антител были разработаны препараты герцептин (Herceptin) и ритуксан (Rituxan), направленные на блокировку рецептора HER-2, однако в клинических испытаниях были отмечены неблагоприятные побочные эффекты, наиболее негативным из которых являлась кардиотоксичность [130, 131]. Поэтому на ген-направленную терапию HER-2-опосредованных неоплазий возлагают большие надежды. Среди препаратов на основе нуклеиновых кислот, применяемых для подавления активности HER-2, в клинические испытания вошел препарат херзим, созданный на основе рибозима типа «головки молотка». В фазе I клинических испытаний этот препарат продемонстрировал хорошую переносимость пациентами [132].

Эукариотический фактор инициации трансляции 4E (eIF4E – eukaryotic translation initiation factor 4E) связывается с 5'-кэпированным концом клеточных мРНК и доставляет их в комплекс инициации трансляции eIF4E. Этот комплекс считывает последовательность мРНК в 5'-3' направлении и расплетает вторичную структуру мРНК в 5'-нетранслируемой области, обнажая стартовый кодон трансляции и способствуя посадке рибосомы [133, 134]. В нормальных условиях активность eIF4E сдерживается специфическим белком, связывающим eIF4E–4E-VP (4E binding protein). При злокачественной трансформации может происходить либо гиперэкспрессия eIF4E, либо фосфорилирование 4E-VP и высвобождение активного eIF4E с формированием комплекса трансляции eIF4E [135]. Исследователями было отмечено, что в опухолях гиперактивный eIF4E усиливает трансляцию преимущественно генов белков, участвующих в опухолевой прогрессии, таких как Vcl-2, сурвивин, циклин D1, С-тус, VEGF [133, 134]. Поэтому избирательная супрессия активности eIF4E может оказаться чрезвычайно важной для ингибирования опухолевой прогрессии. Хороший терапевтический результат продемонстрировал asON, комплементарный eIF4E, который при введении мышам-опухоленосителям вызывал десятикратную регрессию опухоли и отсутствие побочных эффектов [136].

Плейотропин (PTN) является секретлируемым фактором роста, который высоко экспрессируется в период развития нервной системы и «выключается» у взрослых [137], за исключением некоторых онкологических

больных [138]. PTN является активным митогеном для фибробластов и эпителиальных клеток [137, 138]. Кроме того, он может индуцировать выброс активных протеолитических ферментов из эндотелиальных клеток [139]. Эти данные указывают на важную потенциальную роль PTN в ангиогенезе. Для подавления активности гена PTN в опухолевых клетках был разработан рибозим, комплементарный мРНК PTN, который продемонстрировал существенное противоопухолевое и антиметастатическое действия [140]. Более того, недавно было установлено, что ингибирование экспрессии анапластической лимфомной киназы (ALK – anaplastic lymphoma kinase), индуцирующей развитие анапластической лимфомы [141] и являющейся рецептором плейотропина [142], приводило не только к регрессии опухоли, но и к двукратному увеличению средней продолжительности жизни мышей [143].

Опухолевая прогрессия характеризуется способностью распространяться за пределы собственной ткани и развиваться в отдаленных негомолгичных тканях. Модуляция экспрессии генов, вовлеченных в стимуляцию миграции и инвазии, с помощью ген-направленных препаратов также широко применяется исследователями. Матриксная металлопротеиназа-9 (MMP9 – matrix metalloproteinase-9) способна запускать деградацию компонентов внеклеточного матрикса и базальной мембраны (коллагены IV и V, эластин, энтактин, казеин, галектин) [144, 145], что способствует эпителиально-мезенхимальному переходу опухолевых клеток и стимулирует метастазирование [146]. Подавление функции металлопротеиназы с помощью рибозима способствует ингибированию метастазирования и увеличению средней продолжительности жизни мышей-опухоленосителей, однако не приводит к регрессии опухоли [147].

Фактор роста фибробластов (FGF – fibroblast growth factor) привлекает внимание исследователей как мощный митоген, индуцирующий дифференцировку и ангиогенные свойства в период развития, а также стимулирующий инвазию опухолевых клеток [148]. В норме у взрослых FGF синтезируется в чрезвычайно малых количествах, однако часто детектируется при некоторых онкологических заболеваниях [149]. Секретируемый FGF крепко связывается гепаран-сульфатным протеогликаном внеклеточного матрикса, что сдерживает его биологическую активность [150]. Одним из механизмов высвобождения FGF из внеклеточного матрикса является его связывание белком FGF-VP (FGF binding protein), который мобилизует и активирует его [150]. Было показано, что FGF-VP экспрессируется при ряде карцином [151], а также способствует перестроению неонкогенной клеточной линии SW-13, экспрессирующей FGF на онкогенный и ангиогенный фенотип [150]. Рибозим, разработанный для подавления экспрессии гена, кодирующего FGF-VP, эффективно угнетал развитие опухолей у мышей [152].

Фактор раннего ростового ответа (EGR-1 – early growth response factor-1) является типичным представителем семейства транскрипционных факторов, обладающих структурным доменом «цинковый палец» [153]. Активность EGR-1 индуцируется рядом внутренних и внешних факторов, таких как ростовые факторы, цитокины, ультрафиолет, ионизирующее излучение и др. [153] Было показано, что EGR-1 участвует во множестве регулятор-

ных механизмов опухолевых клеток. Его активность связана с развитием злокачественной трансформации [154], транскрипцией гена *MDR1* [155], отрицательной реакцией на эстроген в случае карциномы молочной железы [156]. Для подавления активности гена, кодирующего EGR-1, был создан ДНКазим, который приводил к трехкратному уменьшению размеров опухолей у мышей [157].

Киназа местной адгезии FAK представляет собой не-рецепторную тирозинкиназу, располагающуюся в области интегринового кластера, где цитоскелет клетки взаимодействует с белками внеклеточного матрикса. Здесь FAK получает сигналы от факторов роста и факторов адгезии и передает их внутрь клетки. FAK является важным посредником сигнальных путей пролиферации, миграции и выживаемости клеток и часто гиперэкспрессируется при неоплазиях. siРНК эффективно подавляет активность FAK и рост опухолей у мышей [158].

В случае рака молочных желез трансформированные клетки начинают экспрессировать хемокиновый рецептор СХС (СХСR4), вызывающий метастазирование в органы, содержащие большое количество СХСR4 лигандов. Ингибирование экспрессии СХСR4 с помощью siРНК уменьшает адгезивные и инвазивные свойства опухолевых клеток [159].

#### **ПРИМЕНЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ГЕН-НАПРАВЛЕННЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК, НА МОДЕЛЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ И В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ**

Препараты на основе нуклеиновых кислот давно привлекают внимание исследователей в качестве перспективных средств для ген-направленной терапии онкологических заболеваний благодаря их способности воздействовать на ключевые процессы канцерогенеза. В табл. 2 суммированы основные результаты исследований в этом направлении *in vitro*, а табл. 3 объединяет данные преclinical исследований *in vivo* и клинических испытаний. В данном разделе описано развитие препаратов на основе ген-направленных олигонуклеотидов, разработанных для ингибирования функции генов-мишеней, наиболее тесно связанных с канцерогенезом.

#### **Ras**

*In vitro*. Установленная локализация точечных мутаций в последовательности мРНК онкогена *ras* позволяет разрабатывать препараты олигонуклеотидов, точно адресованные в абберантный сайт мРНК-мишени, и «выключать» работу онкогена с высокой эффективностью. Первым для подавления экспрессии онкогена *ras* был разработан тиофосфатный asON (сейчас известный как ISIS 2503), адресованный к иницирующему кодону мРНК гена *H-ras* [161]. Обработка клеток карциномы шейки матки HeLa, трансфицированных плазмидой, содержащей объединенный ген *ras*-люцифераза, приводила к 98 %-ному подавлению экспрессии репортерного гена. В работах китайских исследователей обработка клеток гепатомы человека тиофосфатным asON в течение 5 дней приводила к ингибированию роста клеток на 87.8 % [162]. При этом наблюдалась блокировка H-ras-зависимого перехода раковых клеток в S-фазу клеточного цикла, а ДНК фрагментация, зафиксированная в обработанных клетках, указывала на запуск апоптоза [162].

Активно исследуется противоопухолевый потенциал рибозимов, направленных на подавление экспрессии генов семейства Ras. На клеточной модели меланомы, карциномы глотки и рака мочевого пузыря разными группами исследователей было показано, что H-ras рибозимы вызывали индукцию апоптоза, ингибирование пролиферации опухолевых клеток и способствовали восстановлению дифференцировки клеток [44–47].

Альтернативным подходом подавления экспрессии генов семейства Ras является применение технологии РНКи. Ретровирус-опосредованная экспрессия siРНК, гомологичной мРНК генов *H-ras* и *K-ras*, эффективно подавляла синтез белков этих генов в клетках рака яичников и карциномы поджелудочной железы [163, 164], снижала пролиферативную активность раковых клеток в результате увеличения количества клеток в G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> фазе клеточного цикла до 66.2 % [163] и увеличивала количество клеток в состоянии апоптоза с 4 до 21 % [163]. Чанг с соавторами, применив аденовирусную систему доставки K-ras-siРНК в клетки, получил 80 %-ное снижение количества белка K-ras в клетках рака легкого и подавление пролиферации опухолевых клеток [165].

*In vivo*. Предварительная трансфекция клеток гепатоцеллюлярной карциномы с помощью asON, направленной на подавление онкогена *H-ras*, приводила не только к снижению веса опухолей у мышей [162, 166], но и ингибировала процессы метастазирования [166]. Эффективность противоопухолевого действия asON ISIS 2503 у мышей с опухолями предстательной железы увеличивалась при введении в последовательность препарата LNA-нуклеотидов [167]. Препарат asON ISIS 2503 был разрешен для проведения клинических испытаний. В фазе I клинических испытаний пациенты ежедневно в течение 14 дней получали инъекции asON ISIS 2503 в дозе 10 мг/кг [168]. Через неделю курс инъекций повторяли. asON ISIS 2503 не проявил выраженной токсичности и в некоторых случаях способствовал стабилизации заболевания. Результаты фазы II клинических испытаний с участием пациентов, страдающих аденокарциномой поджелудочной железы, определили переносимость сочетанного применения asON ISIS 2503 и гемцитабином и показали положительный ответ на лечение в 10.4 % случаев [48].

Применение анти-H-ras рибозимов *in vivo* приводило к существенному торможению роста опухолей у мышей, снижению их инвазивного потенциала и двукратному увеличению продолжительности жизни животных [43–45]. Киджима и соавторы разработали рибозим, направленный в область кодона 12 мутантного транскрипта гена *K-ras* (замена триплета GGT на GTT), и получили рекомбинантный аденовирус, экспрессирующий рибозим [169]. Внутритропухолевое введение такого препарата атимусным мышам с трансплантированной карциномой поджелудочной железы вызвало регрессию опухоли у 68 % мышей [169].

Обработка клеток *in vitro* ретровирусным вектором, содержащим siРНК, гомологичной мРНК генов *K-ras* и *H-ras*, приводила к полному подавлению роста карциномы поджелудочной железы и 80 %-ному ингибированию развития рака яичников у мышей [163, 164]. Однократная внутритропухолевая инъекция siРНК в составе аденовируса, гомологичная мРНК гена *K-ras*, подавляла развитие рака легких на 45 %,

Таблица 2. Применение препаратов на основе нуклеиновых кислот в экспериментах *in vitro*

Гены-мишени	Препарат	Тип опухоли	Эффект
H-ras/ K-ras	asON	Карцинома шейки матки [161], гепатома [162]	Снижение экспрессии H-ras-люцифераза-мРНК на 98% [161]; ингибирование роста клеток на 87.8%, блокирование перехода в S-фазу клеточного цикла, запуск апоптоза [162]
	Рибозим	Меланома, карцинома глотки, рак мочевого пузыря	Снижение экспрессии H-ras; замедление пролиферации опухолевых клеток, повышение уровня их дифференцированности [43-47]
	siРНК	Карцинома яичников, поджелудочной железы [163], легкого [165]	80%-ное снижение уровня белка [165], подавление пролиферативной активности [163,164], изменение режима клеточного цикла, увеличение количества клеток в состоянии апоптоза [163]
c-myc	asON	Лейкемия [170], карцинома молочных желез [171]	50-95%-ное снижение экспрессии гена <i>c-myc</i> [170, 171]; полный арест клеточного цикла в фазе G <sub>1</sub> /G <sub>1</sub> [172]
	Рибозим	Гепатома	Понижение уровня белка в 1.7 раза, снижение пролиферативной активности в 1.85 раза [173]
	siРНК	Эпидермоидная карцинома, нейробластома [175], карцинома молочных желез и аденокарцинома легких [176]	60-92%-ное снижение мРНК гена, 55-85%-ное ингибирование синтеза белка [175,176]; замедление и остановка деления клеток [175]
PKC-α	asON	Карцинома легких	Снижение уровня мРНК гена PKC-α на 90-95% [55]
	Рибозим	Глиобластома [178], карцинома предстательной железы [179]	Снижение уровня белка на 73%, снижение пролиферативной активности на 90% [178]; восстановление чувствительности к цисплатину [179]
Кластерин	asON OGX-001	Карцинома почек	Снижение мРНК кластерина на 64%, увеличение чувствительности клеток к паклитакселу на 80% [59]
IGF-1R	asON	Карцинома мочевого пузыря	Снижение мРНК гена на 74% и белка на 61.3% [207]
bcl-2	asON G3139 (Genasense™, США)	Лимфома [183], лейкемия [68, 69]	Снижение уровня мРНК гена <i>bcl-2</i> и белка Bcl-2 на 60-80% и 80-95%, соответственно, 76-90%-ное увеличение гибели клеток в результате индукции апоптоза, увеличение чувствительности к доксорубину [68, 69, 183]
	Рибозим	Лимфома	Снижение уровня мРНК в 5 раз, белка - в 3 раза, двукратное увеличение количества событий апоптоза [184]
	siРНК	Карцинома шейки матки человека [185] и поджелудочной железы [189]	Подавление синтеза белка Bcl-2 на 90%, индукция апоптоза в 50% клеток [185]; увеличение доли клеток в состоянии апоптоза на 37% [189]
Сурвивин	asON	Злокачественная мезотелиома легких, глиома, карцинома молочных желез, аденокарцинома легких [76], рак щитовидной железы [77]	7-8-кратное увеличение активности каспазы-3, индукция клеточной гибели по механизму апоптоза в 42.5% клеток [76]; снижение уровня мРНК на 75% и белка на 73%, ингибирование клеточной пролиферации на 53%, 11-кратное увеличение доли клеток в состоянии апоптоза [77]
	Рибозим	Меланома [78, 79], карцинома молочных желез [80]	Снижение уровня мРНК и белка на 75 и 74%, повышение чувствительности опухолевых клеток к химиопрепаратам и лучевой терапии, отсутствие эффекта без дополнительного апоптоз-индуцирующего стимула [78-80]
bcr-abl	asON	Хронический миелолейкоз	Полное апоптоз-индуцирующее ингибирование роста клеток [208]
	Максизим	Хронический миелолейкоз	95%-ное снижение уровня мРНК химерного гена, индукция апоптоза, торможение роста опухолевых клеток [85]
	siРНК	Хронический миелолейкоз	Подавление BCR-ABL-ассоциированного роста клеток, увеличение чувствительности опухолевых клеток к иматинибу в 4 раза [87]
	ДНКазим	Хронический миелолейкоз	Подавление экспрессии белка на 40-75% [208]
c-raf	asON	Рак легкого, толстого кишечника, предстательной железы [190, 191], яичников [192, 193]	100%-подавление белка C-raf, 80%-ное ингибирование пролиферации [190-192]; подавление роста клеток различных линий карциномы яичников от 10 до 90% [193]
	siРНК	Рак мочевого пузыря	Снижение количества белка на 37.5% [194]
MDR1, mdr1a/ mdr1b	asON	Аденокарцинома толстого кишечника [211], эпидермоидная карцинома [212]	Полное обращение фенотипа МЛУ, увеличение накопления доксорубидина в клетках в 6.4 раза, их гибель [211, 212]
	siRNA	Эпидермоидная карцинома человека [215], карциномы желудка и поджелудочной железы человека [217], клетки рака яичников [218], лимфосаркома мыши [219]	Снижение уровня мРНК гена <i>MDR1</i> на 91% и белка Р-гликопротеина на 72-83%, увеличение чувствительности клеток к винбластину [99, 215], дуанорубидину [217] и паклитакселу [218]
	Рибозим	Рак печени	Обращение фенотипа МЛУ, увеличение чувствительности клеток к винкристину [214]
Глутатион	»	Рак толстого кишечника	Увеличение чувствительности опухолевых клеток к химиопрепаратам [101]
DNMT1	asON MG98	Карцинома легких и мочевого пузыря	Восстановление функции <i>p16</i> , накопление гипометилированной формы ретинобластомы, ингибирование пролиферации [107]
hTERT	asON	Рак мочевого пузыря [111, 112]	Снижение уровня белка на 97%, увеличение чувствительности клеток к цитостатикам, трехкратное увеличение доли апоптотических клеток, активация каспазы-3 [111, 112]
	Рибозим	Карцинома молочных желез	Сокращение длины теломерного тандема с 5.5 тыс.п.н. до 3.5 тыс.п.н., снижение скорости роста клеток [224]
RRR2	asON GTI-2040 (Genasense™, США)	Карцинома легких, мочевого пузыря, фибросаркома	Практически полное исчезновение мРНК субъединицы R2 [116]
	siРНК	Аденокарцинома поджелудочной железы	Увеличение чувствительности опухолевых клеток к гемцитабину [198]
	asON	Рак молочных желез и мочевого пузыря	Снижение уровня VEGF на 45-83%, снижение клеточной выживаемости [124]
VEGF, Flt-1 (VEGFR1), KDR (VEGFR2)	siРНК	Рак яичников, рак шейки матки, остеосаркома	Снижение экспрессии гена <i>VEGF</i> на 33-53% [125]
	Рибозим Ангиозим, Sirna Ther., США	Карцинома лёгких, толстого кишечника и молочных желез	Специфическое расщепление РНК-субстрата, эффективное понижение уровня мРНК в культуре клеток [199]
	ДНКазим	Карцинома молочных желез	Снижение уровня VEGFR-2 на 90%, 34-65%-ное понижение выживаемости клеток за счет индукции апоптоза [200]
	asON	Карцинома яичников и молочных желез	Аддитивное ингибирование пролиферации опухолевых клеток в сочетании с доксорубицином [205]
neu (HER-2/erbB2)	Рибозим Херзим	Карцинома яичников и молочных желез	Снижение уровня мРНК <i>neu</i> на 40-60%, ингибирование клеточного роста [131]
	asON LY2275796	Неходжкинская лимфома, рак легких, мочевого пузыря, толстого кишечника, предстательной и молочной железы	Снижение белка eIF4E на 80%, снижение уровня белков Bcl-2, сурвивина, циклина D1, C-мус и VEGF, индукция апоптоза [136]
PTN и ALK	Рибозим (анти-PTN)	Меланома	Снижение мРНК <i>PTN</i> на 75% [140]
	Рибозим (анти-ALK)	Глиобластома	Снижение активности PTN [143]
MMP9	Рибозим	Рак предстательной железы	Полное расщепление мРНК <i>MMP9</i> [220]
	siРНК	Детская костная саркома	50%-ное снижение миграции клеток [221]
FGF-BP	Рибозим	Карцинома предстательной железы и толстого кишечника [152, 222]	80%-ная супрессия синтеза белка FGF-BP, замедление пролиферации опухолевых клеток [152, 222]
EGR-1	ДНКазим	Карцинома молочных желез	Понижение уровня белка в 6 раз, блокирование пролиферации, 3-кратное ослабление инвазии опухолевых клеток [157]
FAK	siРНК	Карцинома предстательной и молочных желез	Ингибирование клеточной адгезии, миграции и пролиферации [158]
CXCR4	»	Карцинома молочных желез	Ингибирование миграции и инвазии клеток более чем на 70% [225]

а многократный режим инъекций полностью подавлял рост опухоли у 8 из 10 мышей. При этом апоптотическая активность опухолевых клеток увеличивалась в 2,8 раза [165].

### С-МУС

*In vitro.* Первым кандидатом в препараты, направленные на специфическое подавление протоонкогена *c-myc*, выступил фосфодиэфирный аsON, который вызывал 50 %-ное снижение уровня белка в клетках лейкемии и ингибировал их пролиферацию на 50 % после пятидневной инкубации с олигонуклеотидом [170]. Уотсон и соавторы разработали тиофосфатный аsON, который продемонстрировал более продолжительное (до 9 дней) и эффективное (75 %) подавление пролиферации клеток карциномы молочных желез и вызывал 95 %-ное ингибирование эстроген-индуцированной гиперэкспрессии гена *c-myc* [171]. Следующим этапом стала замена в структуре анти-*c-myc* аsON тиофосфатного остова на морфолино-фосфодиамидатный. Этот олигонуклеотид не только вызывал снижение уровня белка, но и приводил к полному аресту клеточного цикла в фазе G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> [172].

Для подавления активности гена *c-myc* был разработан рибозим типа «головки молотка». Трансфекция клеток ретровирусным вектором, содержащим рибозим, приводила к снижению количества белка в клетках гепатомы в 1,7 раза и снижала пролиферативный потенциал клеток в 1,85 раза [173].

Способность подавлять гиперфункцию белка С-мус была оценена и для ген-направленных препаратов на основе siРНК. Было показано, что siРНК вызывает 60–92 %-ное снижение уровня мРНК гена и 55–83 %-ное ингибирование синтеза белка [174, 175]. Подавление экспрессии гена *c-myc* было ассоциировано с 2,5-кратным торможением роста клеток в случае эпидермоидной карциномы человека KB-3-1 и полной остановкой деления в случае нейробластомы SK-N-MC [175]. Для повышения стабильности и облегчения проникновения в клетки был разработан поли-ДНФ-РНК (поли-2-О-(2,4-динитрофенил)-олигорибонуклеотид – poly-DNP-RNA). Этот препарат снижал уровень мРНК гена *c-myc* до 15 % в клетках молочных желез и аденокарциномы легких [176].

*In vivo.* В экспериментах *in vivo* было показано, что морфолино-олигонуклеотид AVI-4126 (AVIBioPharma, США), разработанный для ингибирования экспрессии гена *c-myc*, вызывает 80 %-ное подавление роста опухоли предстательной железы у атимусных мышей [50]. Сейчас этот препарат находится в фазе II клинических испытаний [52]. В фазе I клинических испытаний AVI-4126 было отмечено отсутствие серьезных побочных эффектов у здоровых людей после однократной внутривенной инъекции AVI-4126 в дозе 90 мг [51]. Параллельно оценивали биоаккумуляцию препарата в тканях опухолей предстательной и молочных желез через сутки после введения препарата в дозе 90 мг (анализ проводили после хирургического удаления опухолей у пациентов) [51].

Подавление экспрессии гена *c-myc* с помощью РНКи в преклинических испытаниях выглядит достаточно обнадеживающим. Клетки карциномы молочных желез, трансфецированные плазмидой, содержащей анти-*c-myc*-siРНК, при трансплантации мышам не давали развития опухоли [177]. На модели трансгенных мышей с развивающейся лимфомой методом ОТ-ПЦР в реальном времени было

зафиксировано снижение экспрессии мРНК гена *c-myc* под действием поли-ДНФ-РНК в плазме крови больных мышей до 15–20 % [176].

### PKC-α

*In vitro.* Для подавления экспрессии гена *PKC-α* Дин с соавторами провели тщательное исследование эффективности 20 тиофосфатных аsON и их 2'-О-метильных аналогов [55]. Наиболее результативный олигонуклеотид (известный под коммерческим названием ISIS 3521) способствовал снижению уровня мРНК гена *PKC-α* на 90–95 %, а его 2'-О-метильное производное в тех же концентрациях не оказывало влияния на активность гена *PKC-α*, что указывает на исключительную необходимость в этом случае активности РНКазы H [55].

На модели глиобластомы оценивали ингибирующий потенциал анти-*PKC-α* рибозима. Было показано, что уровень белка под действием рибозима снижался на 73 %, а пролиферативная активность клеток снижалась на 90 % по сравнению с 50 % при использовании контрольного рибозима [178]. В другом эксперименте рибозим, направленный на нарушение экспрессии *PKC-α*, восстанавливал чувствительность клеток карциномы предстательной железы к индуцированному цисплатином апоптозу в 2,6–3,2 раза [179].

*In vivo.* Внутривенные инъекции ISIS 3521 мышам с гетеротрансплантатами трех различных опухолевых моделей (карцинома легких, мочевого пузыря и толстого кишечника) вызывали полное подавление роста опухолей у мышей уже при дозе препарата 0,06–0,6 мг/кг [55]. В фазе I клинических испытаний аsON ISIS 3521 при исследовании нескольких различных режимов введения препарата наибольшая токсичность проявлялась в форме тромбоцитопении и усталости [180]. В фазе II клинических испытаний при применении рекомендованной схемы лечения 2 мг/кг/день в течение 3 недель у одного пациента с карциномой яичников был зафиксирован объективный ответ на лечение и у двух пациентов с карциномой яичников наблюдалась регрессия опухолей [181]. Однако при лечении пациентов, страдающих метастатической формой карциномы толстого кишечника, никакого достоверного ответа на лечение не наблюдалось [182].

### КЛАСТЕРИН

*In vitro.* Для подавления экспрессии кластерина был разработан тиофосфатный аsON, который ингибировал активность гена на 64 % и увеличивал чувствительность клеток карциномы почки к паклитакселу на 80 % [59].

*In vivo.* 2'-метоксиэтил-модифицированный тиофосфатный аsON OXG-011 в сочетании с паклитакселом вызывал двукратное уменьшение объема карциномы почек у мышей [59]. В фазе I клинических испытаний аsON OXG-011 в дозе 640 мг снижал уровень кластерина в опухолевой ткани у человека [60]. На данный момент в фазе II клинических испытаний исследуют потенциал аsON OXG-011 в сочетании с химиопрепаратами.

### Bcl-2

*In vitro.* Несомненными лидерами среди ген-направленных олигонуклеотидов, применяемых для лечения онкологи-

ческих заболеваний, являются препараты, направленные против мРНК гена антиапоптотического белка Bcl-2. Китада и соавторы разработали 18-звенный фосфодиэфирный аsON, комплементарный первым 6 кодомам открытой рамки считывания в мРНК гена *bcl-2*. Этот олигонуклеотид практически полностью останавливал синтез белка Bcl-2 в клетках лимфомы [183]. Рид и коллеги провели сравнение ингибирующего действия фосфодиэфирного и тиофосфатного олигонуклеотидов, комплементарных мРНК *bcl-2*, на рост клеток лейкемии, гиперэкспрессирующих этот ген [68]. Было показано, что ингибирующий эффект фосфодиэфирного аsON детектируется приблизительно вдвое раньше, чем действие тиофосфатного аналога. Однако последний более эффективно подавляет рост раковых клеток: тиофосфатный аsON достигает эффекта фосфодиэфирного аsON в пяти-десятикратно сниженной концентрации [68]. Далее было показано, что 80–95 %-ное снижение синтеза белка Bcl-2 под действием тиофосфатного аsON увеличивает гибель клеток в результате индукции апоптоза и чувствительность клеток к доксорубину [69].

Луци с соавторами [184] разработали химически модифицированный рибозим, направленный к мРНК гена *bcl-2*. Липотрансфекция такого препарата в клетки лимфомы человека Раджи (Raji) приводила к пятикратному снижению уровня мРНК гена *bcl-2* и трехкратному снижению количества белка, что сопровождалось достоверным увеличением доли клеток, находящихся в состоянии апоптоза [184].

Фу с соавторами использовали siРНК, направленную к мРНК гена *bcl-2*. Под действием специфической siРНК происходило подавление синтеза белка Bcl-2 на 90 % в клетках рака шейки матки HeLaB2 и BGC-823, что способствовало индукции апоптоза [185].

**In vivo.** Снижение уровня белка Bcl-2 под действием аsON, названного G3139, адресованного к мРНК гена, способствовало подавлению онкогенного потенциала клеток лимфомы и полному блокированию роста опухолей у мышей [186]. Применение G3139 в комбинации с цисплатином увеличивало противоопухолевый потенциал химиопрепарата на 70 % [187].

Недавно Моррис и соавторы [188] сообщили о результатах первой фазы клинических испытаний 18-звенного тиофосфатного аsON G3139 (Genasense™, США), комплементарного первым 6 кодомам открытой рамки считывания гена *bcl-2*. Показано, что через 7 сут после ежедневного внутривенного введения препарата в дозе 6.9 мг/кг у больных неходжкинской лимфомой отмечались незначительные побочные эффекты, такие как отечность и обратимое повышение уровня транслугтаминаз в сыворотке крови. Подкожное введение препарата вызывало выраженную стабилизацию опухолевого процесса у 9 из 21 больного неходжкинской лимфомой и повышение качества жизни у 3 больных (общий объективный ответ у 57 % пациентов). В сентябре 2000 г. открыта фаза III клинических испытаний аsON G3139 у больных с хроническим лимфолейкозом и острым миелолейкозом [70]. Продолжаются клинические испытания препарата в комбинациях с химиопрепаратами у больных с меланомой и карциномой предстательной железы, резистентных к гормонотерапии [71, 72]. В феврале 2001 года в 65 онкологических центрах США, Канады и Великобритании

была начата фаза III клинических испытаний этого препарата у больных с множественной миеломой.

У мышей-опухоленосителей, получавших лечение *bcl-2* siРНК, наблюдалось торможение роста опухоли печени на 66.5 % [185]. У мышей с гетеротрансплантатами опухолей поджелудочной железы отмечалось снижение объема опухолей на 56 % [189].

### Raf-1

**In vitro.** Для подавления активности белка Raf-1 был разработан 20-звенный тиофосфатный аsON ISIS 5132, направленный к 3'-нетранслируемому району мРНК гена *c-raf*. Этот олигонуклеотид эффективно ингибировал экспрессию мРНК *c-raf* и снижал количество белка в клетках карциномы легких, толстого кишечника и предстательной железы [190]. Введение 2'-метоксиэтил модификации в структуру олигонуклеотида (асON ISIS 13650), направленного на подавление экспрессии гена *c-raf*, незначительно увеличивало ингибирующий потенциал препарата [191]. В клетках карциномы яичников ISIS 5132 и ISIS 13650 вызывали 100 %-ное подавление белка Raf-1 и 80 %-ное ингибирование пролиферации клеток [192]. Далее потенциал анти-*c-raf* аsON ISIS 5132 и ISIS 13650 оценивали на 15 линиях клеток карциномы яичников. Эффективность подавления роста клеток варьировала от 10 до 90 %. Ингибирование роста сопровождалось апоптозом и накоплением клеток в G<sub>2</sub>/M и S фазах [193].

При сравнении эффективности подавления экспрессии гена *c-raf* с помощью аsON и siРНК, адресованных в один и тот же участок последовательности мРНК, было установлено, что в концентрации 125 нМ олигонуклеотид вызывал снижение белка Raf-1 на 52.4 %, тогда как siРНК лишь на 37.5 % [194].

**In vivo.** Олигонуклеотид ISIS 5132 проявлял значительный противоопухолевый эффект на мышцах с гетеротрансплантатами клеток карциномы яичников [192]. Результаты, полученные в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, позволили перевести исследования противоопухолевой активности ISIS 5132 в клиническую практику. В фазе I клинических испытаний было показано, что препарат достаточно хорошо переносится пациентами, и лишь в некоторых случаях наблюдается кратковременная тромбоцитопения [195]. Была разработана малотоксичная схема лечения: медленное внутривенное введение препарата в дозе 2 мг/кг/день курсом в 21 день с перерывом между курсами в 1 неделю [195]. В фазе II клинических испытаний применение подобранной схемы для лечения пациентов с раком предстательной железы [92], яичников [93] и аденокарциномы толстого кишечника [94] продемонстрировало стабилизацию заболевания приблизительно в 25 % случаев.

### DNMT1

**In vitro.** Для специфического ингибирования фермента ДНК-метилтрансферазы DNMT1 в раковых клетках был разработан 2'-O-метильный тиофосфатный аsON MG98. Было показано, что подавление экспрессии DNMT1 под действием аsON приводит к деметилированию промотора гена *p16*, восстановлению его активности, накоплению гипометилированной формы гена ретинобластомы и ингибированию пролиферации раковых клеток [107].

**In vivo.** В экспериментах *in vivo* asON MG98 вызывал существенное замедление роста и регрессию гетеротрансплантатов карциномы кишечника и немелкоклеточного рака легких. Успешные преклинические исследования обеспечили применение MG98 в клинических испытаниях [196]. Фаза I клинических испытаний была направлена на исследование токсичности и фармакологического профиля asON MG98. Внутривенное введение препарата пациентам с различными солидными опухолями в дозе 80 мг/м<sup>2</sup>/день в течение 21 дня каждые 4 недели оказалось сравнительно безопасным [196]. Однако какого-либо видимого противоопухолевого эффекта отмечено не было. Более высокие дозы препарата, вводимые по предложенной схеме, плохо переносились пациентами [196, 197]. В фазе II клинических испытаний проводили тестирование усовершенствованной схемы введения препарата пациентам с метастатической почечной карциномой: 360 мг/м<sup>2</sup> дважды в неделю в течение 3 недель [108]. Однако лечение по такой схеме также не дало положительной реакции у пациентов. Исследователи объясняют неудачу неподходящим выбором типа онкологического заболевания [108].

### RRR2

**In vitro.** Исследование тиофосфатного asON GTI-2040, мишенью для которого является мРНК RRR2, показало, что под действием олигонуклеотида мРНК RRR2 практически полностью исчезает в клетках карциномы легких человека и существенно снижается в клетках мочевого пузыря человека и в клетках фибросаркомы мышей [116].

Даксбери с соавторами исследовали способность siРНК увеличивать чувствительность аденокарциномы поджелудочной железы человека, имплантированной мышам, к гемцитабину, подавляя экспрессию субъединицы RRR2. Специфические молекулы siРНК, адресованные к мРНК гена RRR2, существенно повышали гемцитабин-индуцированную цитотоксичность [198].

**In vivo.** В экспериментах *in vivo* анти-RRR2 siРНК в комбинации с гемцитабином продемонстрировала синергическое противоопухолевое и антиметастатическое действие [198].

Ингибирующий потенциал GTI-2040 был исследован в экспериментах на животных. GTI-2040 подавлял рост опухолей во всех экспериментальных моделях, а максимальный эффект наблюдался на модели карциномы почек, когда отмечалась 95–98%-ная регрессия опухоли [116]. Исследование asON GTI-2040 в фазе I клинических исследований показало, что рекомендуемой схемой лечения является ежедневное введение препарата в дозе 185 мг/м<sup>2</sup>/день в течение 21 дня каждые 4 недели. При подобном способе монотерапии каких-либо серьезных побочных эффектов не наблюдалось [117].

### VEGF

**In vitro.** В экспериментах *in vitro* было показано, что тиофосфатный asON, направленный к мРНК гена *VEGF*, способен подавлять синтез белка на 45–83 % в клеточных линиях рака молочных желез и мочевого пузыря [124].

В качестве эффективного ингибитора экспрессии VEGF была оценена и стратегия РНКи. Векторная доставка siРНК в опухолевые клетки приводила к продолжительному подавлению синтеза VEGF на 33–53 % [125].

Для терапевтического вмешательства в патологический ангиогенез был предложен альтернативный подход, который заключался в выборе в качестве мишени не VEGF непосредственно, а рецепторов VEGFR-1 и VEGFR-2. С этой целью были разработаны рибозимы, комплементарные последовательности мРНК гена *Flt-1*, кодирующего VEGFR-1 и мРНК гена *KDR*, кодирующего VEGFR-2 [199]. Было показано, что эти препараты специфически расщепляют РНК-субстраты *in vitro* и эффективно понижают уровень мРНК в культуре клеток.

Сейчас появляются работы по исследованию ингибирующего действия ДНКазимов на работу рецептора VEGFR-2. Чанг и соавторы продемонстрировали 90 %-ное снижение уровня белка VEGFR-2 и 34–65 %-ное понижение выживаемости клеток карциномы молочных желез за счет индукции апоптоза [200].

**In vivo.** В экспериментах *in vivo* было показано, что ингибирование VEGF с помощью тиофосфатного asON приводило к пятикратному торможению темпов роста карциномы почек у мышей [201].

Для увеличения продолжительности биологического действия и улучшения проникновения в опухолевые клетки были разработаны модифицированные siРНК, направленные на подавление VEGF: внутриопухолевое введение конъюгата холестерин олигоаргинин-siРНК приводило к десятикратному замедлению роста аденокарциномы толстого кишечника [202], а комплекса siРНК с водорастворимым липополимером – к полуторакратному торможению темпов роста аденокарциномы предстательной железы [203]. При этом наблюдалось значительное снижение васкуляризации опухолей и долговременное подавление экспрессии VEGF.

В ходе преклинических испытаний рибозим, мишенью которого является мРНК *Flt-1*, оказывал противоопухолевый, антиангиогенный и антиметастатический эффект на модели метастазирующего рака легких [199]. Мышам с трансплантированной карциномой легких Льюис хирургически имплантировал минипомпы, содержащие рибозим, таким образом, что животные получали препарат в дозах 12–100 мг/кг/день. Через 18 дней минипомпы извлекали и заменяли на новые. В результате лечения отмечалась 92 %-ная регрессия опухолей и снижение количества метастазов в легких на 70–80 % [199]. А у мышей с трансплантированной карциномой кишечника количество метастазов в печени под действием анти-*Flt-1* рибозима снижалось втрое [199]. Этот рибозим получил название ангиозим (Angiozyme, Ribozyme Pharmaceuticals, США) и сейчас проходит клинические испытания фазы I и II с участием пациентов с различными типами опухолей. В фазе I клинических испытаний, завершенных в июне 2001 года, отмечалась хорошая переносимость препарата и стабилизация заболевания у 25 % пациентов [204]. Фаза II клинических испытаний этого препарата у больных со злокачественными опухолями толстого кишечника и молочных желез нацелена на исследование как монотерапии ангиозимом, так и комбинированной терапии в сочетании с использованием традиционных химиопрепаратов [35]. Было показано, что ангиозим снижал сывороточный уровень растворимого VEGFR-1, однако клинического ответа подтверждено не было. Эти данные подчеркивают важность

проведения комбинированной терапии с использованием ген-направленных веществ и стандартных химиопрепаратов. Обнадёживающие результаты были получены в исследованиях, проводимых с участием пациентов, страдающих раком толстого кишечника: одновременное применение ангиозиима с режимом Saltz (комбинации болюсного введения 5-фторурацила, лейковорина и иринотекана) приводило к прогрессии заболевания лишь в 12,5 % случаев по сравнению с 25 % случаев при лечении только химиотерапией [35].

Многообещающие результаты получены при исследовании в условиях *in vivo* ДНКазима, комплементарного мРНК гена *KDR*, кодирующего VEGFR-2. При четырехкратном введении мышам ДНКазима, направленного на инактивацию VEGFR2, отмечалась 75 %-ная регрессия опухоли молочных желез [200]. Антиангиогенное действие ДНКазима способствовало сокращению васкуляризации опухолевой ткани и тем самым стимулировало клеточную гибель в периферических слоях опухоли.

### neu/HER-2 (ErbB-2)

*In vitro*. Был создан асОН, комплементарный онкогену HER-2/*neu*, и исследовано антисен-опосредованное подавление экспрессии HER-2 для повышения противоопухолевой эффективности традиционной химиотерапии. В сочетании с доксорубицином асОН аддитивно подавлял пролиферацию опухолевых клеток [205].

Рибозим, комплементарный мРНК гена *neu*, в составе экспрессирующей плазмидной конструкции эффективно расщеплял РНК-субстрат *in vitro*, а трансфекция клеток карциномы яичников таким препаратом приводила к 50 %-ному подавлению экспрессии гена и 39–42 %-ному снижению белка HER-2 [131].

*In vivo*. асОН, адресованный к мРНК гена *neu*, совместно с доксорубицином вызывал синергическое противоопухолевое действие [205].

В условиях *in vivo* оценивали эффективность ингибирования активности HER-2 с помощью инъекций рекомбинантного аденовируса, кодирующего специфический рибозим [206]. Через 3 дня после внутриопухолевой инъекции в подкожно привитые гетеротрансплантаты карциномы молочных желез в опухолевой ткани наблюдали снижение мРНК гена *neu* на 59 %. Лечение мышей с такими опухолями еженедельными инъекциями в течение 5 недель приводило к 89 %-ной регрессии опухолей [206]. Предварительные результаты фазы I клинических испытаний с участием пациентов с трудноизлечимыми случаями рака молочных желез рибозим, направленный на подавление синтеза HER-2, названный херзимом (Herzyme, Ribozyme Pharmaceuticals, США), показали стабилизацию заболевания, однако при отсутствии какого-либо частичного или полного положительного ответа пациентов на препарат [132].

### ДРУГИЕ ГЕНЫ-МИШЕНИ

Для ингибирования активности IGF-1R был разработан асОН, который вызывал митозин-индуцированную гибель клеток карциномы мочевого пузыря *in vitro* [207], а предварительная инкубация клеток меланомы с этим олигонуклеотидом полностью препятствовала развитию опухолей у мышей [64].

Обработка опухолевых клеток асОН, направленных против сурвивина, способствовала увеличению доли клеток в состоянии апоптоза [76, 77], а применение анти-сурвивин рибозимов повышало чувствительность опухолевых клеток к радио- и химиотерапии [79–80].

В экспериментах *in vitro* была продемонстрирована эффективность препаратов на основе асОН, siРНК, рибозимов и ДНКазимов специфически подавлять экспрессию химерного белка BCR-ABL [84, 85, 87, 208, 209]. В экспериментах *in vivo* наиболее успешным оказался тиофосфатный асОН, комплементарный мРНК гена *BCR-ABL*, внутривенные инъекции которого вдвое увеличивали продолжительность жизни мышей с развивающейся лейкемией [210].

Для подавления экспрессии гена *MDR1* и повышения чувствительности клеток к цитостатикам были разработаны асОН [211, 212] конъюгат асОН с доксорубицином [213], рибозим [214] и siРНК, направленные в различные районы последовательности мРНК гена [215–218]. Было установлено, что эти препараты с высокой степенью эффективности увеличивали или восстанавливали чувствительность опухолевых клеток *in vitro* к доксорубину [211, 213], винбластину [215], винкрестину [214], дуанорубину [217] и паклитакселу [218]. *In vivo* при подкожной трансплантации мышам клеток аденокарциномы толстого кишечника, экспрессирующей анти-*MDR1* рибозим, и последующего лечения доксорубицином наблюдалась практически полная регрессия роста гетеротрансплантатов [98]. Наши эксперименты показали, что анти-*mdr1b* siРНК эффективно подавляет экспрессию гена *mdr1b* в клетках высокорезистентной к химиопрепаратам лимфосаркомы RLS<sub>40</sub> [219] и в комбинации с химиотерапией избирательно стимулирует их гибель *in vitro*, а применение сочетания циклофосфамида и анти-*mdr1b* siРНК *in vivo* приводит к практически полной регрессии лимфосаркомы RLS<sub>40</sub> у мышей и повышает эффективность терапии циклофосфамидом более чем в 3 раза по сравнению с использованием единственно химиопрепарата [99].

Для преодоления МЛУ, опосредованной системой глутатиона, был разработан рибозим, адресованный к мРНК гена  $\gamma$ -глутамилцистеин синтетазы. Этот препарат увеличивал чувствительность раковых клеток толстого кишечника к цисплатину, доксорубину и этопозиду в 1,8, 4,9 и 1,5 раз [101].

Для преодоления hTERT-опосредованной бессмертности раковых клеток были разработаны различные химически модифицированные асОН, направленные к мРНК гена *hTERT*, такие как PNA, 2'-О-метильный асОН, (2-5A) асОН, содержащий 2'5'-олигоаденилат [111, 112]. 2'-О-метильный асОН и (2-5A) асОН оказались наиболее успешными и вызывали более чем 90 %-ную гибель опухолевых клеток *in vitro* [111, 112], а ежедневное внутриопухолевое введение (2–5 A) асОН в течение 14 дней вызывало более чем 50 %-ную регрессию подкожно трансплантированной глиомы [112].

Трансфекция клеток асОН против eIF4E снижала уровень не только самого фактора (на 80 %), но и других опухолевых-ассоциированных белков, таких как Bcl-2, сурвивин, циклин D1, С-мус и VEGF [136]. Внутривенное введение анти-eIF4E асОН мышам-опухоленосителям приводило к десятикратной регрессии опухоли при отсутствии

токсического влияния аsON на здоровые ткани и органы животных [136].

Для подавления аномальной экспрессии PTN были предложены рибозимы. В экспериментах *in vivo* было показано, что анти-PTN рибозимы вызывали замедление роста опухолей меланомы у мышей более чем на 65 % и ингибировали ангиогенез на 70–85 % [140]. Более того, непрямым ингибированием сигнального пути PTN посредством рибозимов, направленных к мРНК гена ALK, являющейся рецептором тирозинкиназы для PTN, приводило к замедлению роста опухолей на 50–95 % и к двукратному увеличению средней продолжительности жизни мышей с трансплантатами глиобластомы [143].

Подавление функции металлопротеиназ под действием рибозимов приводило не к полной гибели опухоли, а к ограничению ее роста, подавлению ангиогенеза и метастазирования [147, 220, 221].

Опосредованная рибозимом 80 %-ная супрессия синтеза белка FGF-ВР способствовала торможению пролиферации клеток карциномы предстательной железы и толстого кишечника [152, 222]. При подкожной трансплантации мышам клеток карциномы предстательной железы, трансфицированных анти-FGF-ВР рибозимом, развития опухолей не наблюдалось [152].

Для подавления активности EGR-1 был создан ДНКазим, адресованный к мРНК транскрипционного фактора EGR-1. Внутритропуховые инъекции этого препарата вызывали трехкратное уменьшение размеров опухолей [157].

Для подавления гиперфункции FAK в клетках предстательной и молочных желез человека была создана siРНК. Трансфекция клеток разработанной siРНК вызывала ингибирование клеточной адгезии, миграции и пролиферации клеток *in vitro*, а *in vivo* способствовала подавлению роста опухолей у мышей [158].

В экспериментах *in vivo* внутривенные инъекции анти-SXCR4 siРНК не только приводили к снижению уровня мРНК SXCR4 в пульмонарной ткани до 10 %, практически полностью блокировали метастазирование опухоли в легкие [159], но и подавляли рост первичных опухолей [223].

Стратегия борьбы с онкологическими заболеваниями с помощью препаратов на основе нуклеиновых кислот является одной из перспективных и быстроразвивающихся областей молекулярной онкологии. Ген-направленные олигонуклеотиды позволяют с высокой эффективностью ингибировать ключевые звенья регуляции злокачественного роста. Эти препараты позволяют не только модулировать клеточную пролиферацию, апоптоз и лекарственную резистентность, но и влиять на межклеточные взаимодействия, способствующие злокачественной прогрессии по организму. Однако стоит отметить, что, несмотря на общий механизм действия ген-направленных олигонуклеотидов, заключающийся в «выключении» гена-мишени, эффективность препаратов, направленных на подавление экспрессии одного и того же гена или, более того, гомологичных одному и тому же району мРНК-мишени, может значительно различаться.

Некоторые коммерческие компании уже предприняли попытки разработки и выпуска противоопухолевых препаратов на основе ген-направленных олигонуклеотидов, в частности аsON и рибозимов, являющихся заслуженными

родоначальниками ген-направленного терапевтического подхода. Как видно из табл. 3, наиболее восприимчивыми к действию аsON оказались гены, участвующие в усилении пролиферации и блокировке апоптоза опухолевых клеток, а такие гены-мишени, как *Flt-1* (VEGFR) и *neu* (HER-2), являются более чувствительными к действию рибозимов. аsON, направленные на подавление экспрессии генов *H-ras*, *c-myc*, *PKC-α*, кластерина, *bcl-2*, *c-raf*, и рибозимы, разрушающие мРНК генов *Flt-1* и *neu*, в настоящее время находятся в клинических испытаниях. Такие представители препаратов на основе ген-направленных нуклеиновых кислот, как ДНКазимы и малые интерферирующие РНК, совсем недавно стали рассматриваться в качестве перспективных терапевтических инструментов, но по количеству успешных исследований быстро приближаются к аsON и рибозимам. Препараты на основе siРНК для лечения пациентов с возрастной дистрофией сетчатки глаза уже находятся в клинических испытаниях. Однако в качестве противораковых средств малые интерферирующие РНК в клинические испытания пока не введены.

Несмотря на безусловные достижения современной онкологии, проблема повышения эффективности методов воздействия на злокачественные новообразования по-прежнему остается крайне актуальной. Одной из основных задач ген-направленной терапии, которую следует особо отметить, является обеспечение доставки препаратов к клеткам-мишеням, что предполагает транспорт к определенным тканям или органам, пересечение плазматической мембраны и проникновение в определенные компартменты внутри клетки. Очевидно, что олигонуклеотиды сами по себе не обладают этими способностями, в связи с чем разработка транспортных систем, позволяющих повысить эффективность действия этих препаратов, является крайне актуальной. Проблема транспорта интересующей исследователя последовательности РНК или ДНК в опухолевую клетку до сих пор остается нерешенной.

Как уже отмечалось, ключевую роль в онкогенезе играют изменения в экспрессии определенных генов, дисфункция которых приводит к нарушениям регуляции сигнальных путей, контролирующих смену фаз клеточного цикла, пролиферацию, апоптоз, генетическую стабильность, дифференцировку и морфогенетические реакции клетки. Эти процессы в клетке тесно взаимосвязаны и зачастую взаимозаменяемы. В ряде ситуаций с помощью препаратов на основе нуклеиновых кислот, воздействуя на конкретный механизм, удается блокировать то или иное звено регуляции злокачественного роста. Однако не стоит забывать, что важнейшей особенностью онкологических заболеваний является развертывание каскадов регуляции выживаемости клетки, которые позволяют ей ускользнуть от ген-направленного молекулярного контроля. Приведенное соображение несколько не умаляет значимости терапии опухолей с использованием препаратов на основе нуклеиновых кислот, ориентированных на конкретный механизм. Однако гибкость, динамичность молекулярного профиля и надежность регулирования функций, важных для выживания опухолевой клетки, требуют дальнейшей многоэтапной оптимизации ген-направленной противоопухолевой терапии. ●

Таблица 3. Применение препаратов на основе нуклеиновых кислот в исследованиях *in vivo*

РНК-мишень	Препарат	Тип опухоли	Эффект	Стадия исследования
H-ras/ K-ras	asON ISIS 2503	Гепатоцеллюлярная карцинома [162, 166]	Снижение веса опухоли у мышей, подавление процессов метастазирования [162, 166]. Низкая токсичность для пациентов, оптимизация схемы лечения [48, 168], совместно с гемцитабином положительный ответ у 10% пациентов, среди них один полный ответ и 4 частичных [48]	II фаза
	Рибозим	Карцинома глотки, поджелудочной железы, мочевого пузыря, меланома	Подавление роста опухоли у мышей в результате увеличения доли опухолевых клеток в состоянии апоптоза, снижение инвазивного потенциала опухоли, увеличение продолжительности жизни животных [43–45, 169]	<i>In vivo</i>
	siPHK	Карцинома поджелудочной железы и яичников [163, 164], рак легких [165]	Ингибирование роста опухолей [163–165]	<i>In vivo</i>
c-myc	asON AVI-4126 (AVIBioPharma, США)	Рак предстательной и молочных желез [50, 51]	Подавление роста опухоли на 80 % у мышей [50] Умеренная токсичность для пациентов, накопление препарата в опухолевой ткани [51]	II фаза
	siPHK	Карцинома молочных желез [177], лимфома [176]	Препятствие развития опухоли [177]; снижение уровня мРНК <i>c-myc</i> в плазме до 15–20% [176]	<i>In vivo</i>
PKC-α	asON ISIS 3521 (Affinitak™, США)	Карцинома мочевого пузыря, рак легких, толстого кишечника [55], рак яичников [181], карцинома толстого кишечника [182]	Полное подавление роста опухолей у мышей при дозе ISIS 3521 0.06–0.6 мг/кг [55]. Умеренная токсичность в клинике [180]; 3 объективных ответа на лечение [181]; отсутствие ответа на лечение [182]	II фаза
Кластерин	asON OGX-001	Карцинома почек [59], рак предстательной железы [60]	В сочетании с паклитакселом двукратное уменьшение объема опухолей у мышей [62]. Снижение уровня кластерина в патологических тканях у пациентов [60]	I/II фаза
IGF-1R	asON	Меланома	Трансфицированные asON клетки полностью препятствовали развитию опухолей [64]	<i>Ex vivo</i>
bcl-2	asON G3139 (Genasense™, США)	Лимфомы, лимфолейкозы, миелолейкозы [186, 187], меланома [71], лимфомы [188], лимфолейкоз [70], карцинома предстательной железы [72]	Снижение объема опухолей у мышей [186], аддитивное противоопухолевое действие asON G3139 и цисплатина [187]. Умеренная токсичность препарата в клинике, стабилизация опухолевого процесса у пациентов, улучшение качества жизни [188]	III фаза
	siPHK	Мышечные опухолевые клетки печени H22 [185], рак поджелудочной железы [189]	Торможение роста опухоли печени у мышей на 66.5% [185]; снижение объема гетеротрансплантатов опухолей поджелудочной железы на 56% [189]	<i>In vivo</i>
bcr-abl	asON	Хронический миелолейкоз	Увеличение средней продолжительности жизни мышей в 2 раза [210]	<i>In vivo</i>
c-raf	asON ISIS 5132 (Neopharm, США)	Рак яичников [93, 192] и предстательной железы [92], аденокарцинома толстого кишечника [94]	Подавление роста опухолей у мышей [192]. Умеренная токсичность препарата в клинике [195], стабилизация заболевания более чем в 25% случаев [92, 93]	II фаза
MDR1, mdr1a/ mdr1b	Рибозим	Аденокарцинома толстого кишечника	Практически полная регрессия опухоли у мышей в эксперименте <i>ex vivo</i> в комбинации с доксорубицином [98]	<i>Ex vivo</i>
	siPHK	лимфосаркома мышцы [99, 219]	Практически полная регрессия опухоли у мышей в эксперименте <i>in vivo</i> в комбинации с циклофосфамидом [102]	<i>In vivo</i>
DNMT1	asON MG98	Немелкоклеточный рак легкого, карцинома толстого кишечника, метастатическая почечная карцинома и другие солидные опухоли [108, 196, 197]	Регрессия опухолей у мышей линии nude [196]. Отсутствие серьезных побочных эффектов, отсутствие клинического ответа у пациентов [108, 196, 197]	II фаза
hTERT	asON	Глиома	Более чем 50%-ная регрессия опухоли [112]	<i>In vivo</i>
RRR2	asON GTI-2040 (Genasense™, США)	Солидные опухоли	Ингибирование роста опухолей во всех исследованных экспериментальных моделях, максимальный эффект при карциноме почек – 95–98%-ная регрессия [116]. Отсутствие серьезных побочных эффектов, оптимизация схемы лечения [117]	II фаза
	siPHK	Аденокарцинома поджелудочной железы	Синергическая цитотоксичность siPHK и гемцитабина [198]	<i>In vivo</i>
VEGF, Flt-1 (VEGFR1), KDR (VEGFR2)	asON	Карцинома почек	5-кратная регрессия опухоли [201]	<i>In vivo</i>
	siPHK	Аденокарцинома толстого кишечника и предстательной железы [202, 203]	10-кратное замедление роста аденокарциномы толстого кишечника [202] и 1.5-кратное ингибирование карциномы предстательной железы [203], подавление васкуляризации опухоли [202, 203]	<i>In vivo</i>
	Рибозим Ангиозим, Sirna Ther., США	Карцинома легких [199], рак толстого кишечника [35, 204], рак молочных желез [35]	Регрессия роста карциномы легких Льюис у мышей на 92%, 70–80%-ное снижение количества метастазов в легких [199]. Хорошая переносимость препарата пациентами, снижение уровня VEGFR-1 в опухолевых клетках, стабилизация заболевания у 25% больных [35, 204]	II фаза
	ДНКазим	Карцинома молочных желез	Регрессия опухоли на 75% у мышей, сокращение плотности сосудов в опухолях, гибель периферических слоев опухоли [200]	<i>In vivo</i>
neu (HER- 2/erbB2)	asON	Рак яичников и молочных желез	Совместно с доксорубицином синергическое противоопухолевое действие [205]	<i>In vivo</i>
	Рибозим Херзим	Карцинома молочных желез	Регрессия опухолей у мышей на 89% [206]. Хорошая переносимость препарата пациентами, стабилизация заболевания [132]	I фаза
eIF4E	asON LY2275796	Карцинома предстательной железы	10-кратная регрессия опухоли, отсутствие токсического эффекта на здоровые органы и ткани у мышей [136]	<i>In vivo</i>
PTN и ALK	Рибозим (анти-PTN)	Меланома	Уменьшение размеров опухолей на 65%, ингибирование васкуляризации на 70–85%, индукция апоптоза [140]	<i>In vivo</i>
	Рибозим (анти-ALK)	Глиобластома	Замедление роста опухоли, двукратное увеличение продолжительности жизни мышей-опухолесенителей [143]	<i>In vivo</i>
MMP9	Рибозим	Метастатические фибробласты [220], рак предстательной железы [147]	8-кратное снижение метастазирования, увеличение средней продолжительности жизни мышей на 1/3, отсутствие влияния на развитие первичной опухоли [147, 220]	<i>Ex vivo</i>
FGF-βP	Рибозим	Карцинома предстательной железы	Угнетение развития опухоли [152]	<i>Ex vivo</i>
EGR-1	ДНКазим	Карцинома молочных желез	Трехкратное подавление роста опухоли [157]	<i>In vivo</i>
FAK	siPHK	Карцинома предстательной и молочных желез	Регрессия опухолей [158]	<i>In vivo</i>
CXCR4	siPHK	Карцинома молочных желез	Практически полное ингибирование метастазирования, снижение уровня мРНК CXCR4 до 10% [159], регрессия опухоли [223]	<i>In vivo</i>

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Belikova A.M., Zarytova V.F., Grineva N.I. // *Tetrahedron Letters*. 1967. № 37. P. 3557–3562.
2. Гринёва Н.И., Карпова Г.Г. // *Молекулярная биология*. 1974. Т. 8. С. 832–844.
3. Гринёва Н.И., Карпова Г.Г., Кузнецова Л.М. и др. // *Молекулярная биология*. 1976. Т. 10. С. 1260–1271.
4. Zamecnik P.C., Stephenson M.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1978. V. 75. № 1. P. 280–284.
5. Falvey A.K., Kantor J.A., Robert-Guroff M.G. et al. // *J. Biol. Chem.* 1974. V. 249. № 22. P. 7049–7056.
6. Lee L.K., Roth C.M. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2003. V. 14. № 5. P. 505–511.
7. Helene C., Toulme J.J. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1990. V. 1049. № 2. P. 99–125.
8. Boiziau C., Tarrago-Litvak L., Sinha N.D. et al. // *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 1996. V. 6. № 2. P. 103–109.
9. Zelphati O., Imbach J. L., Signoret N. et al. // *Nucleic Acids Res.* 1994. V. 22. № 20. P. 4307–4314.
10. Jason T.L., Koropatnick J., Berg R.W. // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2004. V. 201. № 1. P. 66–83.
11. Kurreck J. // *Eur. J. Biochem.* 2003. V. 270. № 8. P. 1628–1644.
12. Pirolo K.F., Rait A., Sleer L.S., Chang E.H. // *Pharmacol. Ther.* 2003. V. 99. № 1. P. 55–77.
13. Stahel R.A., Zangemeister-Wittke U. // *Lung Cancer*. 2003. V. 41. P. 81–88.
14. Tafech A., Bassett T., Sparanese D. et al. // *Curr. Med. Chem.* 2006. V. 13. № 8. P. 863–881.
15. Matsukura M., Shinozuka K., Zon G. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1987. V. 84. № 21. P. 7706–7710.
16. Brown D.A., Kang S.H., Gryaznov S.M. et al. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. № 43. P. 26801–26805.
17. Guvakova M.A., Yakubov L.A., Vladavsky I. et al. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. № 6. P. 2620–2627.
18. Zamaratski E., Pradeepkumar P.I., Chattopadhyaya J. // *J. Biochem. Biophys. Methods*. 2001. V. 48. № 3. P. 189–208.
19. Nielsen P.E., Egholm M., Berg R.H. et al. // *Science*. 1991. V. 254. № 5037. P. 1497–1500.
20. Larsen H.J., Bentin T., Nielsen P.E. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1999. V. 1489. № 1. P. 159–166.
21. Elayadi A.N., Corey D.R. // *Curr. Opin. Investig. Drugs*. 2001. V. 2. № 4. P. 558–561.
22. Gryznow S.M., Lloyd D.H., Chen J.K. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995. V. 92. № 13. P. 5798–5802.
23. Heasman J. // *Dev. Biol.* 2002. V. 243. № 2. P. 209–214.
24. Nasevicius A., Ekker S.C. // *Nat. Genet.* 2000. V. 26. № 2. P. 216–220.
25. Koshkin A.A., Wengel J. // *J. Org. Chem.* 1998. V. 63. № 8. P. 2778–2781.
26. Obika S., Morio K., Hari Y. et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1999. V. 9. № 4. P. 515–518.
27. Wahkestedt C., Salmi P., Good L. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. № 10. P. 5633–5638.
28. Fire A., Xu S., Montgomery M.K. et al. // *Nature*. 1998. V. 391. № 6669. P. 806–811.
29. Downward J. // *Brit. Med. J.* 2004. V. 328. № 7450. P. 1245–1248.
30. Lingel A., Izaurralde E. // *RNA*. 2004. V. 10. № 11. P. 1675–1679.
31. Leung R.K., Whittaker P.A. // *Pharmacol. Ther.* 2005. V. 107. № 2. P. 222–239.
32. Rand T.A., Ginalska K., Grishin N.V. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. V. 101. № 40. P. 14385–14389.
33. Hannon G.J., Rossi J.J. // *Nature*. 2004. V. 431. № 7006. P. 371–378.
34. Kruger K., Grabowski P.J., Zaug A.J. et al. // *Cell*. 1982. V. 31. № 1. P. 147–157.
35. Bagheri S., Kashani-Sabet M. // *Curr. Mol. Med.* 2004. V. 4. № 5. P. 489–506.
36. Schubert S., Kurreck J. // *Curr. Drug Targets*. 2004. V. 5. № 8. P. 667–681.
37. Kore A.R., Vaish N.K., Kutzke U. et al. // *Nucleic Acids Res.* 1998. V. 26. № 18. P. 4116–4120.
38. Ferré-D'Amaré A.R. // *Biopolymers*. 2004. V. 73. № 1. P. 71–78.
39. Santoro S.W., Joyce G.F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. V. 94. № 9. P. 4262–4266.
40. Копнин Б.П. // *Биохимия*. 2000. Т. 65. № 1. С. 5–33.
41. Barbacid M. // *Annu. Rev. Biochem.* 1987. V. 56. P. 779–827.
42. Campbell S.L., Khosravi-Far R., Rossman K.L. et al. // *Oncogene*. 1998. V. 17. № 11. P. 1395–1413.
43. Wang C.H., Tsai L.J., Tsao Y.P. et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002. V. 298. № 5. P. 805–814.
44. Tone T., Kashani-Sabet M., Funato T. et al. // *In Vivo*. 1993. V. 7. № 6A. P. 471–476.
45. Kashani-Sabet M., Funato T., Tone T. et al. // *Antisense Res. Dev.* 1992. V. 2. № 1. P. 3–15.
46. Ohta Y., Kijima H., Ohkawa T. et al. // *Nucleic Acids Res.* 1996. V. 24. № 5. P. 938–942.
47. Ohta Y., Kijima H., Kashani-Sabet M., Scanlon K.J. // *J. Invest. Dermatol.* 1996. V. 106. № 2. P. 275–280.
48. Alberts S.R., Schroeder M., Erlichman C. et al. // *J. Clin. Oncol.* 2004. V. 22. № 24. P. 4944–4950.
49. Bishop J.M. // *Adv. Cancer Res.* 1982. № 37. P. 1–32.
50. Iversen P.L., Arora V., Acker A.J. et al. // *Clin. Cancer Res.* 2003. V. 9. P. 2510–2519.
51. Devi G.R., Beer T.M., Corless C.L. et al. // *Clin. Cancer Res.* 2005. V. 11. № 10. P. 3930–3938.
52. Kipshidze N., Iversen P., Overlie P. et al. // *Cardiovasc. Revasc. Med.* 2007. V. 8. № 4. P. 230–235.
53. Jaken S. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 1996. V. 8. № 2. P. 168–173.
54. Deacon E.M., Pongracz J., Griffiths G., Lord J.M. // *Mol. Pathol.* 1997. V. 50. № 3. P. 124–131.
55. Dean N.M., McKay R., Condon T.P., Bennett C.F. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. № 23. P. 16416–16424.
56. Blaschuk O., Burdzy K., Fritz I.B. // *J. Biol. Chem.* 1983. V. 258. № 12. P. 7714–7720.
57. Rosenberg M.E., Silksens J. // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1995. V. 27. № 7. P. 633–645.
58. Humphreys D.T., Carver J.A., Easterbrook-Smith S.B., Wilson M.R. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. № 11. P. 6875–6881.
59. Zellweger T., Miyake H., July L.V. et al. // *Neoplasia*. 2001. V. 3. № 4. P. 360–367.
60. Chi K.N., Siu L.L., Hirte H. et al. // *Clin. Cancer Res.* 2008. V. 14. № 3. P. 833–839.
61. Blakesley V.A., Stannard B.S., Kalebic T. et al. // *J. Endocrinol.* 1997. V. 152. № 3. P. 339–344.
62. Guo Y.S., Jin G.F., Houston C.W. et al. // *J. Cell Physiol.* 1998. V. 175. № 2. P. 141–148.
63. Singleton J.R., Dixit V.M., Feldman E.L. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. № 50. P. 31791–31794.
64. Resnicoff M., Coppola D., Sell C. et al. // *Cancer Res.* 1994. V. 54. № 18. P. 4848–4850.
65. Tsujimoto Y., Cossman J., Jaffe E., Croce C.M. // *Science*. 1985. V. 228. № 4706. P. 1440–1443.
66. Dive C. // *J. Intern. Med.* 1997. № 740. P. 139–145.
67. Decaudin D., Geley S., Hirsch T. et al. // *Cancer Res.* 1997. V. 57. № 1. P. 62–67.
68. Reed J.C., Stein C., Subasinghe C. et al. // *Cancer Res.* 1990. V. 50. № 20. P. 6565–6570.
69. Chi K.C., Wallis A.E., Lee C.H. et al. // *Breast Cancer Res. Treat.* 2000. V. 63. № 3. P. 199–212.
70. O'Brien S., Moore J.O., Boyd T.E. et al. // *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 2005. V. 13. № 1. P. 6–13.
71. Bedikian A.Y., Millward M., Pehamberger H. et al. // *J. Clin. Oncol.* 2006. V. 24. № 29. P. 4738–4745.
72. Tolcher A.W., Chi K., Kuhn J. et al. // *Clin. Cancer Res.* 2005. V. 11. № 10. P. 3854–3861.
73. Altieri D.C. // *Trends Mol. Med.* 2001. V. 7. № 12. P. 542–547.
74. Altieri D.C., Marchisio P.C. // *Lab. Invest.* 1999. V. 79. № 11. P. 1327–1333.
75. Li F., Ambrosini G., Chu E.Y. et al. // *Nature*. 1998. V. 396. № 6711. P. 580–584.
76. Xia C., Xu Z., Yuan X. et al. // *Mol. Cancer Ther.* 2002. V. 1. № 9. P. 687–694.
77. Du Z.X., Zhang H.Y., Gao da X. et al. // *Exp. Mol. Med.* 2006. V. 38. № 3. P. 230–240.
78. Pennati M., Colella G., Folini M. et al. // *J. Clin. Invest.* 2002. V. 109. № 2. P. 285–286.
79. Pennati M., Binda M., Colella G. et al. // *J. Invest. Dermatol.* 2003. V. 120. № 4. P. 648–654.
80. Choi K.S., Lee T.H., Jung M.H. // *Cancer Gene Ther.* 2003. V. 10. № 2. P. 87–95.
81. Rowley J.D. // *Nature*. 1973. V. 243. № 5405. P. 290–293.
82. Lugo T.G., Pendergast A.M., Muller A.J., Witte O.N. // *Science*. 1990. V. 247. № 4946. P. 1079–1082.
83. Dobrovic A., Morley A.A., Seshadri R., Januszewicz E.H. // *Leukemia*. 1991. V. 5. № 3. P. 187–190.
84. Kuwabara T., Warashina M., Tanabe T. et al. // *Nucleic Acids Res.* 1997. V. 25. № 15. P. 3074–3081.
85. Kuwabara T., Warashina M., Tanabe T. et al. // *Mol. Cell.* 1998. V. 2. № 5. P. 617–627.
86. Druker B.J., Talpaz M., Resta D.J. et al. // *N. Engl. J. Med.* 2001. V. 344. № 14. P. 1031–1037.
87. Wohlbold L., van der Kuip H., Miething C. et al. // *Blood*. 2003. V. 102. № 6. P. 2236–2239.
88. Daum G., Eisenmann-Tappe I., Fries H.W. et al. // *Trends Biochem. Sci.* 1994. V. 19. № 11. P. 474–480.
89. Mayo M.W., Baldwin A.S. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2000. V. 1470. № 2. P. M55–62.
90. Downward J. // *Nat. Cell Biol.* 1999. V. 1. № 2. P. E33–35.
91. Bos J.L. // *Cancer Res.* 1989. V. 49. № 17. P. 4682–4689.
92. Tolcher A.W., Reyno L., Venner P.M. et al. // *Clin. Cancer Res.* 2002. V. 8. № 8. P. 2530–2535.
93. Oza A.M., Elit L., Swenerton K. et al. // *Gynecol. Oncol.* 2003. V. 89. № 1. P. 129–133.
94. Cripps M.C., Figueredo A.T., Oza A.M. et al. // *Clin. Cancer Res.* 2002. V. 8. № 7. P. 2188–2192.
95. Ставровская А. // *Биохимия*. 2000. Т. 65. № 1. С. 95–106.
96. Gottesman M.M., Fojo T., Bates S.E. // *Nat. Rev. Cancer*. 2002. V. 2. № 1. P. 48–58.
97. Ambudkar S.V., Kimchi-Sarfaty C., Sauna Z.E. // *Oncogene*. 2003. V. 22. № 47. P. 7468–7485.
98. Gao Z., Gao Z., Fields J.Z., Boman B.M. // *Int. J. Cancer*. 1999. V. 82. № 3. P. 346–352.
99. Шкляева О.А. Дис. канд. биол. наук. ИХВФМ СО РАН. Новосибирск. 2009.
100. Tew K.D. // *Cancer Res.* 1994. V. 54. № 16. P. 4313–4320.
101. Nagata J., Kijima H., Hatanaka H. et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001. V. 286. № 2. P. 406–413.
102. Szyf M. // *Drug Resist. Updat.* 2003. V. 6. № 6. P. 341–353.
103. Adams R.L., McKay E.L., Craig L.M., Burdon R.H. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1979. V. 563. № 1. P. 72–81.
104. Kautiainen T.L., Jones P.A. // *J. Biol. Chem.* 1986. V. 261. № 4. P. 1594–1598.
105. Wu J., Issa J.P., Herman J. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993. V. 90. № 19. P. 8891–8895.
106. Strathdee G., MacKean M.J., Illand M., Brown R. // *Oncogene*. 1999. V. 18. № 14. P. 2335–2341.
107. Fournel M., Sapieha P., Beaulieu N. et al. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. № 34. P. 24250–24256.
108. Winquist E., Knox J., Ayoub J.P. et al. // *Invest. New Drugs*. 2006. V. 24. № 2. P. 159–167.
109. Bryan T.M., Cech T.R. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 1999. V. 11. № 3. P. 318–324.
110. Artandi S.E., DePinho R.A. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2000. V. 10. № 1. P. 39–46.
111. Pitts A.E., Corey D.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. V. 95. № 20. P. 11549–11554.
112. Kondo S., Kondo Y., Li G. et al. // *Oncogene*. 1998. V. 16. № 25. P. 3323–3330.
113. Engström Y., Eriksson S., Jildevik I. et al. // *J. Biol. Chem.* 1985. V. 260. № 16. P. 9114–9116.
114. Fan H., Villegas C., Huang A., Wright J.A. // *Cancer Res.* 1998. V. 58. № 8. P. 1650–1653.
115. Fan H., Villegas C., Wright J.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996. V. 93. № 24. P. 14036–14040.
116. Lee Y., Vassilakos A., Feng N. et al. // *Cancer Res.* 2003. V. 63. № 11. P. 2802–2811.

117. Desai A.A., Schilsky R.L., Young A. et al. // *Ann. Oncol.* 2005. V. 16. P. 958–965.
118. Folkman J. // *N. Engl. J. Med.* 1971. V. 285. № 21. P. 1182–1186.
119. Dvorak H.F., Brown L.F., Detmar M., Dvorak A.M. // *Am. J. Pathol.* 1995. V. 146. № 5. P. 1029–1039.
120. Zachary I., Glikli G. // *Cardiovasc. Res.* 2001. V. 49. № 3. P. 568–581.
121. Houck K.A., Ferrara N., Winer J. et al. // *Mol. Endocrinol.* 1991. V. 5. № 12. P. 1806–1814.
122. Polorak Z., Cohen T., Sivan R. et al. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. № 11. P. 7151–7158.
123. Petrova T.V., Makinen T., Alitalo K. // *Exp. Cell Res.* 1999. V. 253. № 1. P. 117–130.
124. Förster Y., Meye A., Krause S., Schwenzer B. // *Cancer Lett.* 2004. V. 212. № 1. P. 95–103.
125. Zhang L., Yang N., Mohamed-Hadley A. et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. V. 303. № 4. P. 1169–1178.
126. Ferrara N., Heinsohn H., Walder C.E. et al. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1995. V. 752. № 246–256.
127. Stern D.F., Heffernan P.A., Weinberg R.A. // *Mol. Cell Biol.* 1986. V. 6. № 5. P. 1729–1740.
128. Di Fiore P.P., Pierce J.H., Fleming T.P. et al. // *Cell.* 1987. V. 51. № 6. P. 1063–1070.
129. Gusterson B.A. // *Eur. J. Cancer.* 1992. V. 28. № 1. P. 263–267.
130. Baselga J., Norton L., Albanell J. et al. // *Cancer Res.* 1998. V. 58. № 13. P. 2825–2831.
131. Lui V.W., He Y., Huang L. // *Mol. Ther.* 2001. V. 3. № 2. P. 169–177.
132. Tafach A., Bassett T., Sparanese D., Lee C.H. // *Curr. Med. Chem.* 2006. V. 13. № 8. P. 863–881.
133. De Benedetti A., Graff J.R. // *Oncogene.* 2004. V. 23. № 18. P. 3189–3199.
134. Mamane Y., Petroulakis E., Rong L. et al. // *Oncogene.* 2004. V. 23. № 18. P. 3172–3179.
135. Gingras A.C., Kennedy S.G., O'Leary M.A. et al. // *Genes Dev.* 1998. V. 12. № 4. P. 502–513.
136. Graff J.R., Konicek B.W., Vincent T.M. et al. // *J. Clin. Invest.* 2007. V. 117. № 9. P. 638–2648.
137. Li Y.S., Milner P.G., Chauhan A.K. et al. // *Science.* 1990. V. 250. № 4988. P. 1690–1694.
138. Wellstein A., Fang W.J., Khatri A. et al. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. № 4. P. 2582–2587.
139. Kojima S., Inui T., Muramatsu H. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995. V. 216. № 2. P. 574–581.
140. Czubayko F., Schulte A.M., Berchem G.J., Wellstein A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. № 25. P. 14753–14758.
141. Morris S.W., Kirstein M.N., Valentine M.B. et al. // *Science.* 1994. V. 263. № 5151. P. 1281–1284.
142. Stoica G.E., Kuo A., Aigner A. et al. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 20. P. 16772–16779.
143. Powers C., Aigner A., Stoica G.E. et al. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 16. P. 14153–14158.
144. Ochieng J., Fridman R., Nangia-Makker P. et al. // *Biochemistry.* 1994. V. 33. № 47. P. 14109–14114.
145. Sires U.L., Griffin G.L., Broekelmann T.J. et al. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. № 3. P. 2069–2074.
146. Bernhard E.J., Muschel R.J., Hughes E.N. // *Cancer Res.* 1990. V. 50. № 13. P. 3872–3877.
147. Sehgal G., Hua J., Bernhard E.J. et al. // *Am. J. Pathol.* 1998. V. 152. № 2. P. 591–596.
148. Gospodarowicz D., Ferrara N., Schweigerer L. et al. // *Endocr. Rev.* 1987. V. 8. № 2. P. 95–114.
149. Yan G., Fukabori Y., McBride G. et al. // *Mol. Cell Biol.* 1993. V. 13. № 8. P. 4513–4522.
150. Czubayko F., Smith R.V., Chung H.C., Wellstein A. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. № 45. P. 28243–28248.
151. Okamoto T., Tanaka Y., Kan M. et al. // *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 1996. V. 32. № 2. P. 69–71.
152. Aigner A., Renneberg H., Bojunga J. et al. // *Oncogene.* 2002. V. 21. № 37. P. 5733–5742.
153. Khachigian L.M., Collins T. // *J. Mol. Med.* 1998. V. 76. № 9. P. 613–616.
154. Huang R.P., Fan Y., de Belle I. et al. // *Int. J. Cancer.* 1997. V. 72. № 1. P. 102–109.
155. Gill P.K., Gescher A., Gant T.W. // *Eur. J. Biochem.* 2001. V. 268. № 15. P. 4151–4157.
156. Gu Z., Lee R.Y., Skaar T.C. et al. // *Cancer Res.* 2002. V. 62. № 12. P. 3428–3437.
157. Mitchell A., Dass C.R., Sun L.Q. et al. // *Nucleic Acids Res.* 2004. V. 32. № 10. P. 3065–3069.
158. Tsutsumi K., Kasaoka T., Park H.M. et al. // *Int. J. Oncol.* 2008. V. 33. № 1. P. 215–224.
159. Liang Z., Yoon Y., Votaw J. et al. // *Cancer Res.* 2005. V. 65. № 3. P. 967–971.
160. Bouchard C., Staller P., Eilers M. // *Trends Cell Biol.* 1998. V. 8. № 5. P. 202–206.
161. Monia B.P., Johnston J.F., Ecker D.J. et al. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. № 28. P. 19954–19962.
162. Liao Y., Tang Z.Y., Liu K.D. et al. // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 1997. V. 123. № 1. P. 25–33.
163. Yang G., Thompson J.A., Fang B., Liu J. // *Oncogene.* 2003. V. 22. № 36. P. 5694–5701.
164. Brummelkamp T.R., Bernards R., Agami R. // *Cancer Cell.* 2002. V. 2. № 3. P. 243–247.
165. Zhang Z., Jiang G., Yang F., Wang J. // *Cancer Biol. Ther.* 2006. V. 5. № 11. P. 1481–1486.
166. Liao Y., Tang Z.Y., Ye S.L. et al. // *Hepatogastroenterology.* 2000. V. 47. № 32. P. 365–370.
167. Fluiter K., Frieden M., Vreijling J. et al. // *Chembiochem.* 2005. V. 6. № 6. P. 1104–1109.
168. Adjei A.A., Dy G.K., Erlichman C. et al. // *Clin. Cancer Res.* 2003. V. 9. № 1. P. 115–123.
169. Kijima H., Yamazaki H., Nakamura M. et al. // *Int. J. Oncol.* 2004. V. 24. № 3. P. 559–564.
170. Wickstrom E.L., Bacon T.A., Gonzalez A. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988. V. 85. № 4. P. 1028–1032.
171. Watson P.H., Pon R.T., Shiu R.P. // *Cancer Res.* 1991. V. 51. № 15. P. 3996–4000.
172. Hudziak R.M., Summerton J., Weller D.D., Iversen P.L. // *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 2000. V. 10. № 3. P. 163–176.
173. Cheng J., Luo J., Zhang X. et al. // *Cancer Gene Ther.* 2000. V. 7. № 3. P. 407–412.
174. Kabilova T.O., Chernolovskaya E.L., Vladimirova A.V., Vlassov V.V. // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2004. V. 23. № 6–7. P. 867–872.
175. Kabilova T.O., Chernolovskaya E.L., Vladimirova A.V., Vlassov V.V. // *Oligonucleotides.* 2006. V. 16. № 1. P. 15–25.
176. Shen L., Zhang C., Ambrus J.L. et al. // *Oligonucleotides.* 2005. V. 15. № 1. P. 23–35.
177. Wang Y.H., Liu S., Zhang G. et al. // *Breast Cancer Res.* 2005. V. 7. № 2. P. 220–228.
178. Leirdal M., Sioud M. // *Br J Cancer.* 1999. V. 80. № 10. P. 1558–1564.
179. Orlandi L., Binda M., Folini M. et al. // *Prostate.* 2003. V. 54. № 2. P. 133–143.
180. Nemunaitis J., Holmlund J.T., Kravynak M. et al. // *J. Clin. Oncol.* 1999. V. 17. № 11. P. 3586–3595.
181. Yuen A.R., Halsey J., Fisher G.A. et al. // *Clin. Cancer Res.* 1999. V. 5. № 11. P. 3357–3363.
182. Marshall J.L., Eisenberg S.G., Johnson M.D. et al. // *Clin. Colorectal Cancer.* 2004. V. 4. № 4. P. 268–74.
183. Kitada S., Miyashita T., Tanaka S., Reed J.C. // *Antisense Res. Dev.* 1993. V. 3. № 2. P. 157–169.
184. Luzi E., Papucci L., Schiavone N. et al. // *Cancer Gene Ther.* 2003. V. 10. № 3. P. 201–208.
185. Fu G.F., Lin X.H., Han Q.W. et al. // *Cancer Biol. Ther.* 2005. V. 4. № 8. P. 822–829.
186. Cotter F.E., Johnson P., Hall P. et al. // *Oncogene.* 1994. V. 9. № 10. P. 3049–3055.
187. Wacheck V., Heere-Ress E., Halaschek-Wiener J. et al. // *J. Mol. Med.* 2001. V. 79. № 10. P. 587–593.
188. Morris M.J., Tong W.P., Cordon-Cardo C. et al. // *Clin. Cancer Res.* 2002. V. 8. № 3. P. 679–683.
189. Ocker M., Neureiter D., Lueders M. et al. // *Gut.* 2005. V. 54. № 9. P. 1298–1308.
190. Monia B.P., Johnston J.F., Geiger T. et al. // *Nat. Med.* 1996. V. 2. № 6. P. 668–675.
191. Monia B.P. // *Anticancer Drug Des.* 1997. V. 12. № 5. P. 327–339.
192. McPhillips F., Mullen P., Monia B.P. et al. // *Br. J. Cancer.* 2001. V. 85. № 11. P. 1753–1758.
193. Mullen P., McPhillips F., MacLeod K. et al. // *Clin. Cancer Res.* 2004. V. 10. № 6. P. 2100–2108.
194. Lou T.F., Gray C.W., Gray D.M. // *Oligonucleotides.* 2003. V. 13. № 5. P. 313–324.
195. Cunningham C.C., Holmlund J.T., Schiller J.H. et al. // *Clin. Cancer Res.* 2000. V. 6. № 5. P. 1626–1631.
196. Davis A.J., Gelmon K.A., Siu L.L. et al. // *Invest. New Drugs.* 2003. V. 21. № 1. P. 85–97.
197. Stewart D.J., Donehower R.C., Eisenhauer E.A. et al. // *Ann. Oncol.* 2003. V. 14. P. 766–774.
198. Duxbury M.S., Ito H., Zinner M.J. et al. // *Oncogene.* 2004. V. 23. № 8. P. 1539–1548.
199. Pavco P.A., Bouhana K.S., Gallegos A.M. et al. // *Clin. Cancer Res.* 2000. V. 6. № 5. P. 2094–2103.
200. Zhang L., Gasper W.J., Stass S.A. et al. // *Cancer Res.* 2002. V. 62. № 19. P. 5463–5469.
201. Shi W., Siemann D.W. // *Anticancer Res.* 2004. V. 24. № 1. P. 213–218.
202. Kim W.J., Christensen L.V., Jo S. et al. // *Mol. Ther.* 2006. V. 14. № 3. P. 343–350.
203. Kim W.J., Chang C.W., Lee M., Kim S.W. // *J. Control. Release.* 2007. V. 118. № 3. P. 357–363.
204. Weng D.E., Masci P.A., Radka S.F. et al. // *Mol. Cancer Ther.* 2005. V. 4. № 6. P. 948–955.
205. Roh H., Hirose C.B., Boswell C.B. et al. // *Surgery.* 1999. V. 126. № 2. P. 413–421.
206. Suzuki T., Anderegg B., Ohkawa T. et al. // *Gene Ther.* 2000. V. 7. № 3. P. 241–248.
207. Sun H.Z., Wu S.F., Tu Z.H. // *Cell Res.* 2001. V. 11. № 2. P. 107–115.
208. Smetsers T.F., Skorski T., van de Locht L.T. et al. // *Leukemia.* 1994. V. 8. № 1. P. 129–140.
209. Takamori K., Kubo T., Zhelev Z. et al. // *Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf).* 2005. V. 49. P. 333–334.
210. Skorski T., Nieborowska-Skorska M., Nicolaides N.C. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. V. 91. № 10. P. 4504–4508.
211. Bertram J., Palfner K., Killian M. et al. // *Anticancer Drugs.* 1995. V. 6. № 1. P. 124–134.
212. Kostenko E.V., Laktionov P.P., Vlassov V.V., Zenkova M.A. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2002. V. 1576. № 1–2. P. 143–147.
213. Ren Y., Zhan X., Wei D., Liu J. // *Biomed. Pharmacother.* 2004. V. 58. № 9. P. 520–526.
214. Wang H., Chen X.P., Qiu F.Z. // *World J. Gastroenterol.* 2003. V. 9. № 7. P. 1444–1449.
215. Логашенко Е.Б., Черноловская Е.Л., Владимиров А.В. и др. // *ДАН.* 2002. № 386. С. 296–297.
216. Logashenko E.B., Vladimirova A.V., Repkova M.N. et al. // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2004. V. 23. № 6–7. P. 861–866.
217. Nieth C., Priebsch A., Stege A., Lage H. // *FEBS Lett.* 2003. V. 545. № 2–3. P. 144–150.
218. Duan Z., Brakora K.A., Seiden M.V. // *Mol. Cancer Ther.* 2004. V. 3. № 7. P. 833–838.
219. Mironova N., Shklyayeva O., Andreeva E. et al. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2006. V. 91. P. 490–500.
220. Hua J., Muschel R.J. // *Cancer Res.* 1996. V. 56. № 22. P. 5279–5284.
221. Sanceau J., Truchet S., Bauvois B. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 38. P. 36537–36546.
222. Czubayko F., Liaudet-Coopman E.D., Aigner A. et al. // *Nat. Med.* 1997. V. 3. № 10. P. 1137–1140.
223. Lapteva N., Yang A.G., Sanders D.E. et al. // *Cancer Gene Ther.* 2005. V. 12. № 1. P. 84–89.
224. Yeo M., Rha S.Y., Jeung H.C. et al. // *Int. J. Cancer.* 2005. V. 114. № 3. P. 484–489.
225. Chen Y., Stamatoyannopoulos G., Song C.Z. // *Cancer Res.* 2003. V. 63. № 16. P. 4801–4804.

УДК 576.363

# Самоподдержание СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

В.В. Терских\*, Е.А. Воротеяк, А.В. Васильев

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 26

\*E-mail: terskikh@bk.ru

**РЕФЕРАТ** Одним из характерных признаков взрослых стволовых клеток является асимметричное деление, благодаря которому одна дочерняя клетка сохраняет статус стволовых клеток, а другая оказывается комитированной к дифференциации. В последнее время появляются данные, позволяющие заключить, что асимметричное деление имеет еще один важный аспект – обеспечивает самоподдержание стволовых клеток.

**Ключевые слова:** асимметричное деление, стволовые клетки, старение стволовых клеток, самоподдержание стволовых клеток, агресомы, нейробласты дрозофилы.

**Список сокращений:** гемопоэтические стволовые клетки (ГСК), мутантный белок хантингтин Htt, опухолевый супрессор Lgl (lethal giant larvae), стволовые клетки (СК), опухолевый супрессор Discs-large (Dlg), Partitioning defective protein (Par).

## ВВЕДЕНИЕ

Центральным аспектом биологии стволовых клеток является асимметричное деление. Достаточно давно было предположено, что именно с помощью асимметричного деления решаются сразу две проблемы: одна дочерняя клетка сохраняет свойства стволовой и продолжает самоподдерживаться, тогда как другая приобретает способность к дифференциации [1, 2, 3, 4]. Ниши стволовых клеток создают асимметричное микроокружение и контролируют локальные процессы пролиферации и дифференциации стволовых клеток путем интеграции сигналов, поступающих от соседних клеток, от организма и от внешней среды [5]. Ниши создают систему сигналов, направленную на поддержание стволовых клеток, что достаточно детально было изучено на примере герминативных стволовых клеток *Drosophila*. Например, для герминативных стволовых клеток яичника дрозофилы было показано, как сигнал стромальных клеток (Dpp) регулирует самоподдержание стволовых клеток и оказывает влияние на судьбу дочерних клеток [6]. В процессе онтогенеза и при опухолевой трансформации стволовые клетки могут делиться как симметрично, так и асимметрично в зависимости от обстоятельств, в которых они находятся [2].

Асимметричное деление, наряду с межклеточными взаимодействиями, является универсальным механизмом формирования разнообразия клеток, и поэтому оно имеет исключительное значение в развитии многоклеточных организмов. Разнообразие клеточных типов может создаваться двумя основными путями [7]. Один путь заключается

в том, что сначала образуется большое число одинаковых клеток, которые в дальнейшем благодаря межклеточным взаимодействиям приобретают разные пути дифференциации. В другом случае, при асимметричном делении, дочерние клетки оказываются разными, когда в поляризованной материнской клетке в процессе митоза происходит сегрегация определяющих судьбу клеток детерминант только в одну дочернюю клетку. Такое распределение детерминант обеспечивает выбор одной дочерней клеткой определенного пути специализации, который отличается от специализации сестринской клетки.

Для успешного протекания асимметричного деления необходимо осуществление нескольких ключевых процессов.

1. Делящаяся клетка исходно должна быть поляризована. Поляризация может включать различие в структуре отдельных участков клеточной мембраны и неравномерное распределение каких-либо детерминант в кортексе и цитоплазме клетки.
2. Митотическое веретено ориентируется параллельно оси поляризации клетки.
3. Образующееся митотическое веретено также асимметрично. Это выражается в том, что две centrosомы, его образующие, оказываются неодинаковыми.
4. В результате деления детерминанты, определяющие судьбу дочерних клеток, распределяются асимметрично между дочерними клетками.

Оба пути дифференциации клеток и стратегии развития организмов можно видеть у близкородственных нематод [8]. У *Caenorhabditis elegans* и *Acrobeloides nanus* раннее

развитие начинается с асимметричных митозов, и образовавшиеся клетки имеют строго детерминированную судьбу: из 949 митозов, которые происходят при развитии *C. elegans*, 807 являются асимметричными. А у нематоды *Enoplos brevis* вначале образуются одинаковые бластомеры, которые дифференцируются уже в дальнейшем развитии в результате асимметричных делений. Асимметричное деление является консервативным механизмом, обеспечивающим возможность развития дочерних клеток в разных направлениях, поэтому проблема асимметричного деления имеет фундаментальное значение для биологии развития, и в частности для биологии стволовых клеток [9, 7, 10]. Асимметричное деление обнаружено в разных группах организмов: у бактерий [11, 12], дрожжей [7], вольвокса [13], нематод [14], у дрозофилы [15], у позвоночных [16, 17] и растений. Несколько объектов хорошо изучены и считаются классическими. К их числу относятся делящиеся нейробласты дрозофилы [15] и деления первых бластомеров у *Caenorhabditis elegans* [14, 18]. Предпосылки для асимметричного деления клеток, по-видимому, существуют у всех организмов, но их реализация зависит от конкретных условий, в которых находится клетка. Сейчас можно с достаточной уверенностью сказать, что в клетке есть две программы: для симметричного и асимметричного деления. В процессе онтогенеза и при опухолевой трансформации стволовые клетки могут делиться как симметрично, так и асимметрично в зависимости от обстоятельств, в которых они находятся [2]. Например, в эмбриональном развитии мышцы асимметричное деление направлено на регулирование числа нейтральных стволовых клеток. На стадии 12–16 сут гестации в вентрикулярной зоне мозга обнаруживается большое количество апоптотических клеток и одновременно повышается экспрессия церамида. Показано [19], что в это время нейральные прогениторные клетки делятся таким образом, что в них происходит асимметричное распределение нестина и PAR-4 (prostate apoptosis response 4). В результате такого деления одна дочерняя клетка оказывается нестин<sup>-</sup> PAR-4<sup>+</sup>, в которой повышенное содержание церамида вызывает апоптоз, а другая клетка, не экспрессирующая PAR-4, была нестин-положительной и не подвергалась апоптозу. Кроме того, асимметричное деление функционально связано с апоптозом, поскольку некоторые гены, вовлеченные в регуляцию асимметричного деления, контролируют сигнальные пути, ответственные за апоптоз [20]. Переход дочерних клеток в апоптоз, так же как и в дифференцированное состояние, может быть использован в организме для поддержания клеточного гомеостаза. У дрозофилы мутации по некоторым генам в гомозиготном состоянии вызывают нарушение апикально-базальной поляризации клеток и дезорганизацию структуры эпителия, и поэтому такие гены были обозначены как гены клеточной поляризации. Установление и поддержание апикально-базальной поляризации клеток имеет исключительно большое значение для их функционирования и протекания асимметричного митоза. Поляризация клеток контролируется сложным взаимодействием большого числа генов [21, 22]. Потеря клеточной поляризации и связанное с этим нарушение асимметричного митоза могут повлиять на нарушение пролиферативного контроля, что в свою очередь способно вызвать цепь событий, при-

водящих к развитию опухоли. На нейробластах *Drosophila* было показано, что гены, от которых зависит асимметричный митоз, могут быть опухолевыми супрессорами, а мутации этих генов способны вызывать неопластический рост [23, 24].

### АСИММЕТРИЧНОЕ ДЕЛЕНИЕ НЕЙРОБЛАСТОВ ДРОЗОФИЛЫ

Одной из наиболее изученных моделей асимметричного деления являются нейральные прогениторные клетки (нейробласты) *Drosophila*, которые дают начало большей части клеток центральной нервной системы. Нейробласт проходит асимметричное деление и образует две дочерние клетки разного размера. Большая по размеру клетка сохраняет свойства нейробласта и может несколько раз асимметрично разделиться, тогда как меньшая дочерняя клетка, называемая материнской клеткой ганглия, комитирована к дифференциации и делится только один раз, образуя два нейрона или две клетки глии. В поляризации клетки участвует большое число белковых комплексов [25, 26]. Апикально-базальная поляризация нейробласта происходит в позднем периоде G<sub>2</sub>, когда набор белков, получивший название Par комплекс, локализуется в апикальной части клетки. Для успешного протекания митоза необходима правильная локализация белковых комплексов в апикальном кортексе нейробласта [24]. По-видимому, сегрегация базолатеральных и апикальных белковых комплексов основана на их антагонизме, что и вызывает их полярное распределение в клетке.

В нейробласте дрозофилы апикально расположенные белки образуют два комплекса, объединенных адапторным белком Inscuteable. Эволюционно консервативный комплекс Par включает Bazooka/Par3, aPKC, и Par6 и является первым комплексом белков, который локализуется в клеточном кортексе нейробласта и первоначально вовлечен в вытеснение из апикального кортекса белков, которые локализируются в базальной части клетки. Этот белковый комплекс регулирует активность опухолевого супрессора Lgl (lethal giant larvae), который также необходим для правильного таргетинга базальных белковых комплексов. Lgl напрямую ассоциирован с Par6 и в этом комплексе aPKC, по-видимому, инактивирует Lgl путем его фосфорилирования. Благодаря активности нефосфорилированного Lgl белок Miranda рекрутируется в базальный кортекс.

Второй апикальный белковый комплекс содержит белки, связанные с сигнальным путем гетеротримерного G-белка, и включает Gai, Partner of Inscuteable (Pins) и Locomotion defects (Loco). Комплекс Gai-Pins-Loco опосредует образование митотического веретена и правильное его положение (параллельно апикально-базальной оси) по отношению к плоскости деления нейробласта.

Митотическое веретено нейробласта асимметрично, длина его больше в апикальной части, в результате чего оно сдвинуто в сторону базального кортекса. Это обеспечивает, как указано выше, образование клеток разного размера. Центросомы в делящемся нейробласте *Drosophila* оказываются неравнозначными, большая по размеру материнская центросома окружена более экстенсивными астральными микротрубочками и остается в нейробласте в последующих делениях.

Благодаря двум локализованным в кортексе опухолевым супрессорам (Dlg) Discs large и (Lgl) Lethal (2) giant larvae апикальный Par комплекс обеспечивает базальную локализацию РНК-связывающего белка Staufen, транскрипционного фактора Prospero (Pros), белка Numb, ассоциирующегося с плазматической мембраной, и адапторных белков Miranda (Mira) и Partner of Numb (Pon) [27, 28]. Опухолевый супрессор Lgl, являющийся цитоскелетным белком, непосредственно связывается с немышечным миозином II (Zipper), подавляет его активность и предотвращает связывание с апикальным кортексом. Lgl равномерно распределен по всему кортексу клетки. Однако в области апикального кортекса аРКС фосфорилирует и инактивирует Lgl, высвобождая миозин II. Активированный миозин II может формировать филаменты и вытеснять белок Miranda. Напротив, в базальном кортексе Lgl активен, поскольку здесь нет аРКС, и он подавляет активность миозина II, что позволяет белку Miranda локализоваться в базальном кортексе [29]. В противоположность миозину II, который вытесняет детерминанты из апикального кортекса, миозин VI (Jaguar) обеспечивает базальную локализацию и сегрегацию Mira/Pros посредством везикулярного транспорта [30].

Белок Pins может ассоциироваться с белком митотического аппарата Mud (mushroom body defective), ассоциированного с centrosомой и апикальным кортексом, который необходим для правильной ориентации веретена. Dlg и белок Khc-73 (Kinesin-73), находящиеся на плюс-концах астральных микротрубочек, также необходимы для правильного положения веретена. Актиномиозиновый цитоскелет играет важную роль в сборке этих апикальных и базальных белковых комплексов. По-видимому, филаменты актина, а не микротрубочки, участвуют в связывании белков с кортексом. Миозины *Drosophila* II (Zipper) и VI (Jaguar) присутствуют во взаимоисключающих комплексах с Miranda и необходимы для правильной локализации детерминант, определяющих судьбу клетки. Асимметричная локализация Numb регулируется каскадом фосфорилирования, который запускает активированная Aurora-A. Эта киназа фосфорилирует Par-6, регуляторную субъединицу аРКС, что вызывает активацию аРКС. Это, в свою очередь, приводит к фосфорилированию Lgl, который связывает и подавляет аРКС в интерфазе. Фосфорилированный Lgl освобождается от аРКС и позволяет белку Vazooka занять свое место в белковом комплексе. В результате этого меняется специфичность субстрата, и аРКС может фосфорилировать Numb. В фосфорилированном виде Numb локализуется асимметрично в виде серпа в базальной части клетки [31]. Белки базальной части нейробласта образуют два комплекса. Один из этих комплексов содержит адапторный белок Miranda, который ассоциируется с транскрипционным репрессором Brat (Brain tumor) и способствует его асимметричной локализации, гомеодоменный транскрипционный фактор Prospero и белок Staufen, связывающий двунигетивную РНК, который сам может связывать транскрипты *prospero*. Второй комплекс содержит Numb, антагонист белка Notch, и связывающийся с ним Pon (Partner of Numb). После сегрегации в материнскую клетку ганглия Miranda деградирует, что позволяет Prospero транслоцироваться в ядро и активировать гены, вовлеченные в дифференциацию, и репрессировать гены,

вовлеченные в процессы пролиферации. Митотическое веретено принимает активное участие в процессе асимметричного деления. На ряде объектов было показано, что оно образовано структурно и функционально различающимися centrosомами. Митотическое веретено также оказывается асимметричным, поскольку оно образовано структурно и функционально различающимися centrosомами.

Для дрожжей *S. cerevisiae* была предложена «модель компаса» [32, 33], которая состоит в том, что митотическое веретено, подобно магнитной стрелке компаса, располагается в клетке не пассивно, а реагирует на сигналы кортикального слоя цитоплазмы. При почковании дочерней клетки белок Kar9, необходимый для правильной ориентации веретена, располагается на полюсе, который ориентирован в сторону дочерней клетки. Затем Kar9 переходит от полюса на микротрубочки, которые направляются в дочернюю клетку к определенным участкам кортикального слоя цитоплазмы. Эта модель предполагает, что асимметрия веретена необходима для того, чтобы оно могло реагировать на сигналы кортекса и занимать правильное положение в делящейся клетке. В нейробластах дрозофилы [34] и эмбриональном кортексе мозга мыши [35] асимметричное деление клетки сопровождается активным движением митотического веретена. Однако в герминативных стволовых клетках дрозофилы уже в интерфазе centrosомы занимают окончательную позицию, и протекание асимметричного деления происходит при постоянном положении веретена [36].

#### АССИМЕТРИЧНОЕ ДЕЛЕНИЕ У ВЫСШИХ ОРГАНИЗМОВ

У высших организмов асимметричное деление изучено недостаточно. Отдельные данные указывают на то, что эти деления имеют место. Во многих эпителиальных тканях обнаруживаются как симметричные, так и асимметричные деления клеток. Например, при симметричных митозах обе клетки оказываются морфологически одинаковыми и располагаются на базальной мембране, а при асимметричном митозе дочерние клетки морфологически различаются, причем одна из них сразу переходит в супрабазальный слой эпителия. Это позволяет предположить, что при симметричном и асимметричном делениях могут быть разные механизмы миграции клеток в супрабазальный слой. В базальных клетках эпителия пищевода человека описано асимметричное деление [37], при котором митотическое веретено располагается перпендикулярно базальной мембране, и поэтому одна дочерняя клетка сохраняет контакт с базальной мембраной, а другая оказывается в супрабазальном слое эпителия. Авторы предполагают, что таким способом делятся стволовые клетки. В эпидермисе мыши на 12.5-й день эмбрионального развития большая часть эпидермиса однослойна и подавляющее число клеточных делений осуществляется в плоскости эпителия, т.е. они симметричны, однако некоторые клетки делятся перпендикулярно плоскости базальной мембраны. По мере появления многослойного эпидермиса после 15.5-го дня гестации более 70 % клеток имеют вертикально расположенное веретено. Это может говорить о том, что стратификация эпидермиса в значительной мере происходит за счет асимметричных митозов [38]. В эпидермисе хвоста мыши около 30 % клеток базального слоя могут проходить асимметрич-

ное деление [39]. Лампрехт [40] показал, что в базальных клетках эпителия роговицы крысы встречаются как симметричные, так и асимметричные митозы.

Одиночные прогениторные гематопоэтические клетки, выделенные из фетальной печени человека, проходят асимметричные деления *in vitro* [41]. Это выразилось в том, что клетки CD34<sup>+</sup> приблизительно в 30 % случаев давали начало двум дочерним клеткам с разным поведением. Одна клетка оставалась в состоянии покоя до 8 дней, тогда как другая начинала размножаться экспоненциально со временем удвоения, равным 12 ч. Еще чаще (приблизительно в 40 % случаев) асимметрично делились клетки CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>. Вопрос относительно асимметричного деления стволовых клеток у млекопитающих остается пока недостаточно изученным, но некоторые косвенные данные позволяют предположить такую возможность. Стволовые клетки составляют от долей процента до нескольких процентов от всех тканевых клеток и во многих случаях их очень трудно идентифицировать *in situ*. Роль асимметричной сегрегации детерминант в клетках позвоночных практически не изучена, однако были обнаружены гомологи некоторых генов, обеспечивающих прохождение асимметричного митоза у дрозофилы. Эволюционно консервативный ген *numb* обнаружен у многих позвоночных животных [44, 45]. Асимметричные деления происходят в клетках церебрального кортекса хорька [42] и в стволовых клетках церебрального кортекса и нейробластах мыши [43], и для их реализации, так же как и в нейробластах дрозофилы, необходимо асимметричное распределение фактора Numb. Асимметричная локализация Numb обнаружена в делящихся сателлитных клетках мыши [46]. У дрозофилы функция Numb заключается в подавлении сигнализации Notch в процессе нейrogenеза. У позвоночных Numb выполняет те же функции, что и в нейробластах дрозофилы, и участвует в регуляции асимметричного деления клеток млекопитающих [45, 47, 48]. У позвоночных были обнаружены два гомолога Pins [49]. У крысы белку Pins соответствует AGS-3, который экспрессируется только в некоторых тканях. Другой гомолог Pins, LGN, экспрессируется во многих тканях у человека. В интерфазе этот белок находится в цитоплазме, а во время митоза он ассоциируется с полюсами веретена. Подавление экспрессии LGN нарушает организацию веретена и препятствует нормальному расхождению хромосом [50]. Функционирование Insc необходимо для правильной ориентации асимметричного митоза в прогениторных клетках сетчатки крысы [51]. Найдены также гомологи для Par-3, Par-6 и aPKC.

### СТАРЕНИЕ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Вопрос о возрастных изменениях стволовых клеток по мере старения всего организма и тканей, в которых они локализованы, представляет большую важность для биологии стволовых клеток [52]. В быстро обновляющихся тканях (таких как кровь, эпидермис, эпителий кишечника) стволовые клетки составляют заметный компартмент и имеют большой пролиферативный потенциал. Гематопоэтические стволовые клетки мыши функционируют на протяжении жизни животного, а серийные трансплантации показали, что продолжительность жизни стволовых клеток может даже значительно превышать продолжительность жизни

организма. Во многих экспериментах было показано, что старые (aging) клетки костного мозга, так же как и молодые, способны восстанавливать гемопоэз у реципиентов после повторных трансплантаций [53, 54, 55]. После нескольких раундов трансплантации способность стволовых клеток спасать летально облученных животных снижается, однако следует отметить, что при этом может не истощаться пролиферативный потенциал стволовых клеток, но неблагоприятные факторы, связанные с техникой выделения и трансплантации стволовых клеток и облучения донорских ниш [56, 57], проявляют свое действие. Это позволяет предположить, что с возрастом организма в стволовых клетках не происходит существенное снижение пролиферативного потенциала. И тогда, естественно, возникает вопрос: стареют ли стволовые клетки? В настоящее время этот вопрос не может быть решен однозначно. Старение стволовых клеток может быть репликативным (в результате накопления ошибок при повторных пролиферативных циклах) и хронологическим и затрагивать разные аспекты поведения стволовых клеток. Хотя по способности восстанавливать кроветворение гематопоэтические стволовые клетки (ГСК) молодых и старых мышей были сходны, у старых животных было в 5 раз больше ГСК, чем у молодых, но они хуже находили ниши и встраивались в костный мозг облученных реципиентов. У молодых животных ГСК преимущественно были в состоянии покоя, тогда как у старых животных они чаще находились в пролиферативном цикле [58, 59]. Клональный анализ репопулирующих ГСК показал, что у стареющих животных снижается число лимфоидных (lymphoid-biased) ГСК, а число долгоживущих ГСК миелоидного ряда накапливается. Миелоидные ГСК молодых и старых животных ведут себя одинаково во всех отношениях. Это указывает на то, что старение не влияет на свойства индивидуальных СК, но сказывается на клональном составе ГСК. По-видимому, снижение уровня лимфоцитов в крови может быть показателем старения ГСК [60]. Росси с сотрудниками [61] показал, что с возрастом животного в стволовых клетках накапливаются эндогенные нарушения ДНК, что может быть причиной их старения и отразиться на функционировании СК и поддержании тканевого гомеостаза при стрессе. Поведение ГСК при старении организма может зависеть также от генетических факторов, что проявляется у мышей разных линий. Число ГСК у мышей линии DBA с возрастом почти не меняется, а число молодых ГСК даже снижается, тогда как в линии C57BL/6 оба показателя у старых животных существенно увеличены [62].

Есть основания считать, что возрастные изменения стволовых клеток являются обратимыми, поскольку на примере сателлитных клеток скелетной мышцы мыши было показано [63], что при гетерохронном парабиозе происходит омоложение сателлитных клеток старых животных. Возрастные изменения стволовых кроветворных клеток мышей также могут быть обратимыми [64]. Что касается герминативных стволовых клеток, то происходит явное старение ниши, в которой они находятся [65]. Эмбриональные стволовые клетки в условиях культивирования *in vitro*, по-видимому, не стареют [66]. У мыши в течение жизни не обнаружено заметного старения и снижения физиологических функций эпидермальных стволовых кле-

ток [67], что может быть связано с особой биологической значимостью эпидермиса как защитного барьера в жизни животных. Эти данные позволяют говорить о возрастных обратимых (эпигенетических) изменениях стволовых клеток при длительном сохранении их пролиферативного потенциала. В целом можно заключить, что число тканевых стволовых клеток и их функциональное состояние с возрастом организма могут меняться, но при этом стволовые клетки сохраняют способность к самоподдержанию. Одним из процессов, связанных со старением клеток, является образование внутриклеточных белковых включений. Правильное сворачивание (folding) вновь синтезированных белков в клетке требует участия различных белковых кофакторов, известных под именем молекулярных шаперонов. Эти молекулы распознают и связывают растущие цепи полипептидов и частично свернутые белки, чтобы обеспечить им нативную конформацию и предотвратить неправильное сворачивание (misfolding) и последующую агрегацию. Существует несколько семейств шаперонов, в т.ч. белков теплового шока. На протяжении клеточного цикла происходят постоянный синтез и деградация белков. Неправильно свернутые белки или белки, поврежденные в результате окислительного стресса или теплового шока, разрушаются в клетке в результате протеолиза, однако при некоторых условиях клетка оказывается неспособной деградировать неправильно свернутые и поврежденные белки [68], и они могут образовать микроагрегаты. У высших эукариот эти микроагрегаты накапливаются в агресомах, которые образуются в результате направленного транспорта микроагрегатов от периферии клетки к центросомам или центрам организации микротрубочек, где они окружаются промежуточными микрофиламентами [69]. Образование агресом представляет собой генерализованный ответ клетки на скопление агрегированных недеградированных белков. После включения в агресома белки уже не могут быть деградированы протеасомами. Накопление большого количества агресом («биологического мусора») рассматривается как одна из важных причин старения и гибели клеток [70, 71]. Накопление агресом может быть причиной нарушения функции и гибели постмитотических клеток, таких как нейроны или кардиомиоциты. Многие нейродегенеративные патологии, включая болезни Альцгеймера, Паркинсона и Хантингтона, характеризуются избирательной гибелью нейронов, связанной с накоплением агресом, образование которых является результатом ненормального процессинга мутантных неправильно свернутых или поврежденных белков убиквитин-протеасомной системой [72]. Например, мутантный белок хантингтин (Htt, Hantingtin), характерный для болезни Хантингтона, содержит увеличенный полиглутаминовый фрагмент, что способствует образованию агресом. Arrasate et al. [73] показали, что при увеличении в клетках количества диффузного Htt наступает гибель определенных нейронов. Объединение микроагресом с формированием тел включения увеличивает жизнеспособность нейронов и защищает их от токсического действия Htt. Подобным же образом стареющие клетки накапливают окисленные белки,

например карбонилированные белки, которые образуют высокомолекулярные агрегаты, не подверженные деградации [74]. Скопление агресом около центросом до определенной степени не влияет на правильную организацию веретена и течение митоза, но при большом избытке агресом начинается нарушение митоза и функционирования клеток [75]. Функциональная неодинаковость центросом в клетке вызывает асимметричную ориентацию веретена. Это показано для нейробластов дрозофилы [76], стволовых герминативных клеток дрозофилы [77] и клеток почкующихся дрожжей [32]. Асимметрия центросом выражается в частности в том, что только около одной из них накапливаются агресома [75]. Поскольку механизм асимметричного деления в нейробластах дрозофилы хорошо изучен, а сами нейробласты часто используют для моделирования поведения стволовых клеток, они были выбраны для изучения поведения мутантных белков в асимметричном митозе [75]. Была создана рекомбинантная дрозофила, у которой экспрессировался N-концевой фрагмент белка человека Htt, содержащий 128 глутаминовых повторов (Htt-Q128). В культуре изолированных нейробластов было показано, что агрегированный белок Htt-Q128 обычно формировал белковое включение, ассоциированное только с одним полюсом веретена. В результате асимметричного деления включение попадало в новообразованный нейробласт, а материнская клетка ганглия была свободна от поврежденных белков. Эти данные позволяют предположить, что механизм сегрегации агресом в процессе асимметричного митоза может выполнять ту же функцию и в стволовых клетках млекопитающих. В клетках дрозофилы на стадии бластомеры происходят асимметричные деления, и при этом белки, предназначенные для деградации, распределяются асимметрично [78].

Есть указание на то, что в стволовых клетках крипты тонкого кишечника у пациентов со спиноцереbellарной атаксией 3 типа (СЦА-3) происходит асимметричное распределение мутантного белка ataxin-3 [75]. Этот белок не образует включений у нормальных пациентов, а у пациентов с СЦА-3 агресома выявляются в комитированных и дифференцированных клетках, но не образуются в стволовых клетках, находящихся на дне крипты около клеток Панета. Судя по микроскопическим включениям, которые видны в электронном микроскопе, ataxin-3 экспрессируется и в стволовых клетках крипты, но они освобождаются от агресом в результате асимметричного митоза. Эти данные позволяют предположить, что еще одна исключительно важная функция асимметричного деления заключается в самоподдержании линии взрослых стволовых клеток. При этом одна из двух дочерних клеток освобождается от поврежденных недеградируемых молекул белков и сохраняет свой биологический возраст, тогда как другая дочерняя клетка, получающая поврежденные молекулы, или погибает в результате апоптоза, или дифференцируется. Непрерывная пролиферация является необходимым условием самоподдержания взрослых стволовых клеток, поскольку в непролиферирующих клетках поврежденные белки накапливаются, и происходит хронологическое старение клеток. ●

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Watt F.M., Hogan B.L. // *Science*. 2000. V. 287. P. 1427–1430.
2. Morrison S.J., Kimble J. // *Nature*. 2006. V. 441. P. 1068–1074.
3. Fuchs E. // *J. Cell Biol.* 2008. V. 180. P. 273–284.
4. Lin H. // *J. Cell Biol.* 2008. V. 180. P. 257–260.
5. Fuchs E., Tumber T., Guasch G. // *Cell*. 2004. V. 116. P. 769–778.
6. Chen D., McKearin D. // *Curr. Biol.* 2003. V. 13. P. 1786–1791.
7. Horvitz H.R., Herskowitz H. // *Cell*. 1992. V. 68. P. 237–255.
8. Schierenberg E. // *BioEssays*. 2001. V. 23. P. 841–847.
9. Wolpert L. // *J. Cell Sci.* 1988. Suppl. 10. P. 1–9.
10. Knoblich J.A. // *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2001. V. 2. P. 11–20.
11. Newton A., Ohta N. // *Ann. Rev. Microbiol.* 1990. V. 44. P. 689–719.
12. Lawler M.L., Brun Y.V. // *Cell*. 2006. V. 124. P. 891–893.
13. Kirk D., Kaufman M., Keeling R., Stamer K. // *Development*. 1991. V. 1 (Suppl.). P. 67–82.
14. Strome S. // *Int. Rev. Cytol.* 1989. V. 114. P. 81–123.
15. Lin H., Schagat T. // *Trends in Genet.* 1997. V. 13. P. 33–39.
16. Shen Q., Zhong W., Jan Y.N., Temple S. // *Development*. 2002. V. 129. P. 4843–4853.
17. Roegiers F., Jan Y.N. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2004. V. 16. P. 195–205.
18. Guo S., Kempus K.J. // *Curr. Opin. Genet. Develop.* 1996. V. 6. P. 408–415.
19. Bieberich E., MacKinnon S., Silva J., Noggle S., Condie B.G. // *J. Cell Biol.* 2003. V. 162. P. 469–479.
20. Hatzold J., Conradt B. // *PLoS Biol.* 2008. V. 6. Issue 4 | e84.
21. Bilder D., Li M., Perriman N. // *Science*. 2000. V. 289. P. 113–116.
22. Johnson K., Wodarz A. // *Nature Cell Biol.* 2003. V. 5. P. 12–14.
23. Caussinus E., Gonzalez C. // *Nature Genet.* 2005. V. 37. P. 1125–1129.
24. Chia W., Somers W.G., Wang H. // *J. Cell Biol.* 2008. V. 180. P. 267–272.
25. Margolis B., Borg J-P. // *J. Cell Sci.* 2005. V. 118. P. 5157–5159.
26. Assémat E., Bazellières E., Pallesi-Pocachard E. et al. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2008. V. 1778. P. 614–30.
27. Ohshiro T., Yagami T., Zhang C., Matsuzaki F. // *Nature*. 2000. V. 408. P. 593–596.
28. Betschinger J., Mechtler K., Knoblich J.A. // *Nature*. 2003. V. 422. P. 326–330.
29. Barres B.A., Siderovski D.P., Knoblich J.A. // *Neuron*. 2005. V. 48. P. 539–545.
30. Petritsch C., Tavosanis G., Turck C.W. et al. // *Dev. Cell*. 2003. V. 4. P. 273–281.
31. Wirtz-Peitz F., Nishimura T., Knoblich J.A. // *Cell*. 2008. V. 135. P. 161–173.
32. Kusch J., Liakopoulos D., Barral Y. // *Trends Cell Biol.* 2003. V. 13. P. 562–568.
33. Liakopoulos D., Kusch J., Grava S., et al. // *Cell*. 2003. V. 112. P. 561–574.
34. Kaltschmidt J.A., Davidson C.M., Brown N.H., Brand A.H. // *Nature Cell Biol.* 2000. V. 2. P. 7–12.
35. Haydar T.F., Ang E. Jr., Rakic P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003. V. 100. P. 2890–2895.
36. Yamashita Y.M., Jones D.L., Fuller M.T. // *Science*. 2003. V. 301. P. 1547–1550.
37. Seery J.P., Watt F.M. // *Curr. Biol.* 2000. V. 10. P. 1447–1450.
38. Lechler T., Fuchs E. // *Nature*. 2005. V. 437. P. 275–280.
39. Clayton E., Doupe D.P., Klein A.M. et al. // *Nature*. 2007. V. 446. P. 185–189.
40. Lamprecht J. // *Cell Tissue Kinet.* 1990. V. 23. P. 203–216.
41. Huang S., Law P., Francis K. et al. // *Blood*. 1999. V. 94. P. 2595–2604.
42. Chenn A., McConnell S.K. // *Cell*. 1995. V. 82. P. 631–641.
43. Shen Q., Zhong W., Jan Y.N., Temple S. // *Development*. 2002. V. 129. P. 4843–4853.
44. Petersen P.H., Zou K., Hwang J.K. et al. // *Nature*. 2002. V. 419. P. 929–934.
45. Cayouette M., Raff M., Koster R.W., Fraser S.E. // *Nature Neurosci.* 2002. V. 5. P. 1265–1269.
46. Shinin V., Gayraud-Morel B., Gómés D., Tajbakhsh S. // *Nature Cell Biol.* 2006. V. 8. P. 677–687.
47. Wakamatsu Y., Maynard T.M., Jones S.U., Weston J.A. // *Neuron*. 1999. V. 23. P. 71–81.
48. Verdi J.M., Bashirullah A., Goldhawk D.E. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999. V. 96. P. 10472–10476.
49. Yu F., Morin X., Kaushik R. et al. // *J. Cell Sci.* 2003. V. 116. P. 887–896.
50. Du Q., Stukenberg P.T., Macara I.G. // *Nat. Cell Biol.* 2001. V. 12. P. 1069–1075.
51. Igman M., Cayouette M., Charalambous C. et al. // *Neuron*. 2005. V. 48. P. 539–545.
52. Rando T.A. // *Nature*. 2006. V. 441. P. 1080–1086.
53. Harrison D.E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1973. V. 70. P. 3184–3188.
54. Ogden D.A., Micklem H.S. // *Transplantation*. 1976. 22:287–293.
55. Harrison D.E. // *J. Exp. Med.* 1983. V. 157. P. 1496–1504.
56. Ross E.A., Anderson N., Micklem H.S. // *J. Exp. Med.* 1982. V. 155. P. 432–444.
57. Iscove N.N., Nawa K. // *Curr. Biol.* 1997. V. 7. P. 805–808.
58. Morrison S.J., Wandycz A.M.K., Akashi A. et al. // *Nat. Med.* 1996. V. 2. P. 1011–1016.
59. Liang Y., Van Zant G., Szilvassy S.J. // *Blood*. 2005. V. 106. P. 1479–1487.
60. Cho R.H., Sieburg H.B., Muller-Sieburg C.E. // *Blood*. 2008. V. 111. P. 5553–5561.
61. Rossi D.J., Bryder D., Seita J. et al. // *Nature*. 2007. V. 447. P. 725–729.
62. Geiger H., True J.M., de Haan G., Van Zant G. // *Blood*. 2001. V. 98. P. 2966–2972.
63. Conboy I.M., Conboy M.J., Wagers A.J. et al. // *Nature*. 2005. V. 433. P. 760–764.
64. Van Zant G., Scott-Micus K., Thompson B.P. et al. // *Exp. Hematol.* 1992. V. 20. P. 470–475.
65. Jones D.L. // *Stem. Cell Rev.* 2007. V. 3. P. 192–200.
66. Zeng X. // *Stem. Cell Rev.* 2007. V. 3. P. 270–279.
67. Stern M.M., Bickenbach J.R. // *Aging Cell*. 2007. V. 6. P. 439–452.
68. Kopito R.R. // *Trends Cell Biol.* 2000. V. 10. P. 524–530.
69. Johnston J.A., Ward C.W., Kopito R.R. // *J. Cell Biol.* 1998. V. 143. P. 1883–1898.
70. Terman A. // *Redox Rep.* 2001. V. 6. P. 15–26.
71. Bucciantini M., Giannoni E., Chiti F. et al. // *Nature*. 2002. V. 416. P. 507–511.
72. Moore D.J., Dawson V.L., Dawson T.M. // *Molecular Med.* 2003. V. 4. P. 95–108.
73. Arrasate M., Mitra S., Schweitzer E.S. et al. // *Nature*. 2004. V. 431. P. 805–810.
74. Nystrom T. // *EMBO J.* 2005. V. 24. P. 1311–1317.
75. Rujano M.A., Bosveld F., Salomons F.A. et al. // *PLoS Biol.* 2006. V. 4. Issue12: e417.
76. Rebollo E., Sampaio P., Januschke J. et al. // *Developmental Cell*. 2007. V. 12. P. 467–474.
77. Yamashita Y.M., Jones D.L., Fuller M.T. // *Science*. 2003. V. 301. P. 1547–1550.
78. Fuentealba L.C., Eivers E., Geissert D. et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2008. V. 105. P. 7732–7737.

# Ковалентно- связывающиеся антитела подавляют глубокое гликирование: врожденный компонент системы приобретенного иммунитета

Т. Щеглова<sup>1</sup>, С.П. Маккер<sup>2</sup>, А.Трамонтано<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии и генетики, Сибирский филиал РАН, 630090, Россия, Новосибирск, просп. ак. Лаврентьева, д. 10

<sup>2</sup> Отдел педиатрии, Университет штата Калифорния, Дэвис – Медицинская школа Дэвис, Калифорния, США

\*E-mail: tramontano@ucdavis.edu

**РЕФЕРАТ** Неферментативное гликирование белков является причиной метаболического стресса, который приводит к цитотоксичности и вызывает повреждение тканей. Гипергликемия ведет к увеличению количества продуктов глубокого гликирования, которые и вызывают большую часть проявлений сосудистой патологии, приводя к диабетическим осложнениям. Усиленное гликирование иммуноглобулинов и их ускоренное выведение из кровотока является предполагаемым естественным механизмом предотвращения накопления альтернативных продуктов гликирования и, таким образом, смягчения микро-васкулярной патологии. В данной работе продемонстрировано, что антитела против гликопротеина KLN активно реагируют с гликопептидами сыворотки крови диабетиков. Эти реакции обусловлены ковалентным связыванием легких цепей антител и карбонильными группами гликопептидов. Животные, страдающие диабетом, которые были иммунизированы с целью индукции реактивных антител, имели сниженные уровни циркулирующих и связанных в почках продуктов гликирования, что коррелировало с ослаблением диабетической нейропатии. Молекулярный анализ процесса гликирования антител показал, что модифицировались в основном легкие цепи, несущие закодированные в зародышевой линии переменные районы лямбда. Ранее мы наблюдали, что фрагменты антител, несущие переменные районы в зародышевой конфигурации, могут быть выявлены в человеческой Fv библиотеке по способности ковалентно связываться с реактивным фосфорным эфиром. Модификация этих Fv фрагментов происходила по специфическим остаткам в области переменных районов легких цепей, которые соответствовали комбинированному сайту связывания в области взаимодействия легких и тяжелых цепей. Эти данные позволяют предположить, что ковалентное связывание – это естественное свойство антител, которое сохранилось для выполнения определенных физиологических функций. Эта гипотеза обсуждается в связи с современными данными о природных антителах, которые распознают окисленные молекулы собственного организма, и о каталитических аутоантителах, которые обнаруживаются при аутоиммунных заболеваниях.

**Ключевые слова:** метаболический стресс, цитотоксичность, природные аутоантитела, KLN-иммунизированные крысы.

**Список сокращений:** OP (organophosphorus compound) – фосфорорганические соединения, LDL (Low Density Lipoprotein) – липопротеин низкой плотности, nAbs (natural autoantibodies) – природные аутоантитела, AGE (advanced glycation end-products) – конечные продукты глубокого гликирования, RAGE – AGE-рецептор, KLN – пируват-гаптен, конъюгированный с гемодианином миноги, PAMPs (pathogenassociated molecular patterns) – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны, TLR – Toll-like рецептор.

## ВВЕДЕНИЕ

Появление огромного разнообразия антител для защиты от всего разнообразия возможных антигенов – это характерная черта приобретенного иммунитета. Структурной основой приобретенного иммунитета является вариабельность сайтов связывания антигенов на В-клеточных рецепторах и антителах. Соответственно, антитела тесно связаны с генетической рекомбинацией и накоплением мутаций, которые ступенчато улучшают связывание между вариабельными районами антител и комплементарными участками антигена. В отличие от аффинности, которая постепенно усиливается за счет множества слабых взаимодействий, крепкая связь, например ковалентная, могла бы обеспечивать быстрый и эффективный способ захвата некоторых антигенов. Известны ли случаи, когда антитела связываются именно таким образом, и какой цели служит такой механизм связывания?

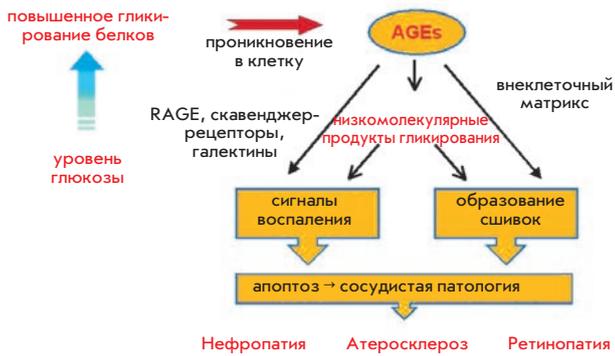
Существование антител, которые ковалентно связываются со своими лигандами, уже давно является предметом исследований, направленных на разработку ферментоподобных каталитических антител [1]. Ферменты используют ковалентные связи, чтобы стабилизировать промежуточные продукты во множестве типов реакций. Реактивная иммунизация считалась многообещающей стратегией для получения антител, которые связывались бы со своими лигандами путем образования ковалентных комплексов [2]. Предполагалось, что такие антитела могут имитировать промежуточные стадии ферментативных реакций, когда фермент связан с субстратом ковалентной связью. Эта гипотеза основана на том, что такая форма связывания может достигаться посредством обычного процесса созревания аффинности при индукции антител. При этом предполагается, что связывание и каталитические функции экспериментально полученных антител являются искусственными и, таким образом, не играют иммунологической роли в природе. Один из первых и наиболее изученных примеров – это иммунизация синтетическими антигенами, содержащими активную дикарбонильную группу. В результате индуцируются антитела, которые связываются через основание Шиффа с образованием енаминовых аддуктов. Было показано, что ковалентно-реактивные клоны обладают значительной альдозазной активностью. Так же как и при обычном созревании аффинности, функция ковалентного связывания кодируется соматически мутированными вариабельными районами иммуноглобулиновых генов, у которых в антиген-связывающем сайте возникает один или более нуклеофильных остатков лизина [3].

## РОЛЬ КОВАЛЕНТНО-СВЯЗЫВАЮЩИХСЯ АНТИТЕЛ В ГЛИКИРОВАНИИ И ПАТОЛОГИИ

Альтернативная гипотеза утверждает, что ковалентно-связывающиеся антитела могут существовать в природе, если такая активность полезна для организма-хозяина. Мы предположили, что связь с антителом посредством одного сильного взаимодействия может быть подходящим механизмом для захвата и выведения измененных субстратов, образующихся при повреждении белков и обновлении клеток. Это может происходить в ситуации с встречающимися в природе, естественными, антителами, которые рас-

познают структуры, образующиеся в собственных клетках в результате окислительных модификаций [4]. Например, некоторые IgM антитела, которые принимают участие в разборке окисленных LDL (Low Density Lipoprotein – липопротеин низкой плотности) частиц, опознают определенные химические структуры в составе окисленных фосфолипидов, в т.ч. фосфорилхолиновую группу в головке липида. Эти антитела, гены которых не подвергаются соматической мутации, кодируются филогенетически консервативными генами зародышевой линии [5]. Считается, что такие природные аутоантитела (nAbs – natural autoantibodies), имеющие такую «врожденную» реактивность, служат постоянно работающей системой очистки, нацеленной на уничтожение собственных измененных антигенов, т.н. «неантигенов», которые появляются в поврежденных клетках и тканях [6]. Эти nAbs также реагируют с фосфорилхолиновыми группами, присутствующими на полисахаридах клеточных стенок бактерий, что позволяет им защищать организм от инфекции [7]. Такая двойная функция может объяснить, почему это свойство антител сохранилось в зародышевой линии в ходе эволюции. Механизм взаимодействия окисленных фосфолипидов с V-зоной nAbs на данном этапе изучается.

Еще одна разновидность цитотоксического метаболита образуется при гликировании или гликоксилировании, поскольку сахара и другие углеводы постоянно окутывают белки и клетки, модифицируя их в ходе неспецифических реакций по экспонированным карбонильным группам. Гликирование – это медленный, но постоянный процесс, который в норме происходит по ходу старения. Однако при диабете процесс гликирования происходит быстрее, поскольку нарушен гликемический контроль, и часто наступает гипергликемия. Важность этого механизма оказалась весьма значительной, поскольку на данном этапе роль конечных продуктов глубокого гликирования (AGE – advanced glycation end-products) в сосудистых осложнениях при диабете сейчас уже твердо установлена [8–10]. Необычайное разнообразие AGE-белков образует особый класс измененных собственных антигенов хозяина, которые пока слабо охарактеризованы. AGE участвуют в развитии патологии сосудистой ткани через два основных механизма: изменение архитектуры внеклеточного матрикса из-за сшивки белков и модуляция клеточных функций путем взаимодействия со специфическими рецепторами на клеточной поверхности. В разнообразные механизмы развития тканевой токсичности вовлечены многочисленные рецепторы, участвующие в связывании AGE-продуктов, включая AGE-рецептор (RAGE), скавенджер-рецептор макрофагов, галектин-3 и мегалин [11–15]. Совместно это процессы вносят вклад в прогрессию патологических осложнений диабета, включая сердечно-сосудистые заболевания, нефропатию и микроваскулярные заболевания (рис. 1). На данный момент рассматривается несколько подходов к терапии связанного с AGE патогенеза, в том числе фармакологическое ингибирование формирования AGE [16] и биофармакологическое блокирование AGE-рецепторов [17]. Теоретически природный компенсаторный механизм, устраняющий цитотоксические AGE-продукты из циркуляции, мог бы, таким образом, уменьшать патологический эффект продолжающегося или чрезмерного гликирования. Такой сценарий, скорее



**Рис. 1.** Продукты глубокого гликирования при патологии. Продукты гликирования белков в результате гипергликемии или в ходе старения модифицируются и образуют продукты глубокого гликирования. Эти AGE-продукты впоследствии могут распадаться на гликованные пептиды и низкомолекулярные AGE. И высоко- и низкомолекулярные AGE могут сорбироваться в сосудистой ткани, на клеточных рецепторах и путем сшивки с внеклеточным матриксом. Такие модификации вызывают цитотоксичность и некроз тканей, что в итоге приводит к сосудистым патологиям, которые часто являются осложнениями при диабете

всего, включал бы регуляторные элементы, усиливающие защиту в моменты повышенного стресса.

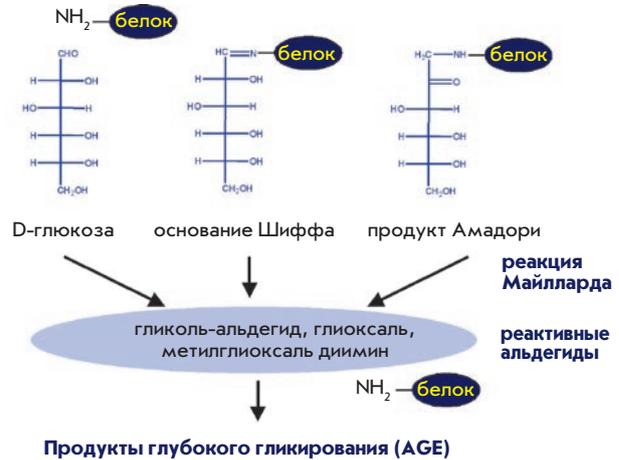
Существует ли молекулярный механизм, с помощью которого антитела могли бы выполнять такую роль для поддержания нормальной клеточной функции? Хотя AGE-продукты весьма гетерогенны, их общим свойством является то, что промежуточные продукты, возникающие при их образовании, часто содержат химически реактивную карбонильную группу, происходящую из сахаров. Первичное возникновение карбонильной группировки на белках происходит в ходе реакции Амадори. После этого карбонилы сохраняются в разнообразных белковых аддуктах, образующихся в ходе реакции Майларда. Их дальнейшая деградация приводит к образованию низкомолекулярных альдегидов, диальдегидов и гликованных пептидов, которые могут снова вступать в реакцию, модифицируя новые остатки в белках (рис. 2). Таким образом, сформировалось понятие карбонильного стресса, которое означает хронические патологии, возникающие в результате гликирования и окисления. Очевидным механизмом, способным подавлять образование цитотоксических AGE-продуктов, является снижение карбонильной нагрузки. В организме это может происходить путем продукции естественных гасителей карбонила, способствующих выведению этих продуктов из циркуляции. Тем самым выполняется функция, сходная с действием фармакологических препаратов, испытываемых для AGE-терапии [18]. Ковалентное связывание с антителами имело бы в этом отношении существенные преимущества, которых нет у антител, связывающихся по обычному механизму. В этом гипотетическом иммунном процессе узнавание разнообразных молекул одним антителом достигается в результате прямого ковалентного связывания одного и того же реактивного остатка, представляющего «химический автограф» измененного собственного или чужеродного антигена. В этом отличие

от узнавания обычных эпитопов, определяющихся несколькими отличающимися структурами во всех возможных модифицированных мишенях.

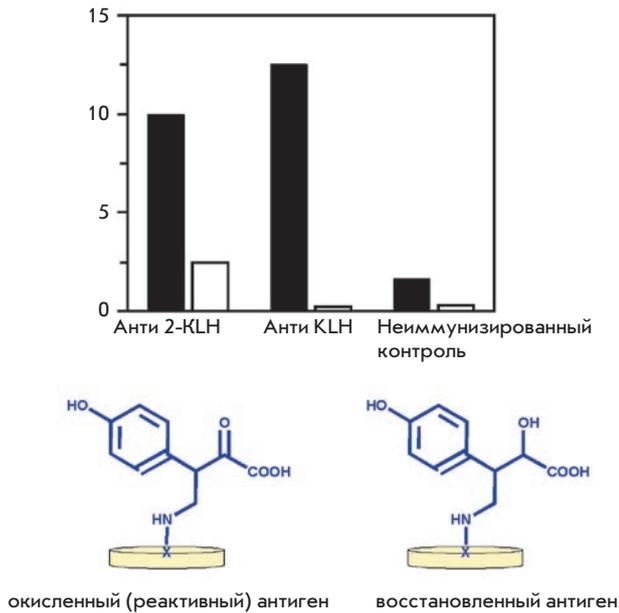
Благоприятное химическое взаимодействие продуктов гликирования с пулом нормальных антител было предложено в более ранних работах по гликированию легких цепей нормальных иммуноглобулинов. Гликованные легкие (L) цепи являются одним из трех основных белков плазмы крови у больных диабетом [19]. Более того, оказалось, что гликованные пептиды животных, страдающих диабетом, реагируя с нормальными IgG, преимущественно модифицируют легкие цепи [20]. В то время как большинство белков гликуруются до какого-то уровня, некоторые могут быть более активны, чем другие. Таким образом, модификация иммуноглобулинов сама по себе не является сюрпризом. Но избирательность по отношению к легким цепям показывает, что высокореактивные остатки могут быть локализованы в специфическом участке, рядом или внутри варибельного района легких цепей. Предметом дальнейшего исследования может явиться зависимость вариации химической реактивности IgG от белковой последовательности в варибельном районе. Из вышесказанного следует, что должно быть возможным получение специфических антител с повышенной реактивностью на продукты гликирующего стресса.

**ИНДУКЦИЯ КОВАЛЕНТНО-СВЯЗЫВАЮЩИХСЯ АНТИТЕЛ**

Чтобы проверить приведенную выше гипотезу, мы попытались показать, что ковалентно-связывающиеся антитела могут индуцироваться во время обычного иммунного ответа, и это может снижать гликирующий стресс путем уменьшения карбонильной нагрузки. Реактивная иммунизация



**Рис. 2.** Реактивные карбонилы и альдегиды являются промежуточными продуктами реакции при образовании цитотоксических AGE. Продукты неглубокого гликирования в основном получаются в результате реакции Амадори при реакции белков с восстанавливающими сахарами. Дальнейший, неферментативный распад этих продуктов приводит к образованию дополнительных реактивных альдегидов, которые сами могут модифицировать белки и образовывать сшивки. Эти процессы объединяются под общим названием реакции Майларда и приводят к образованию AGE



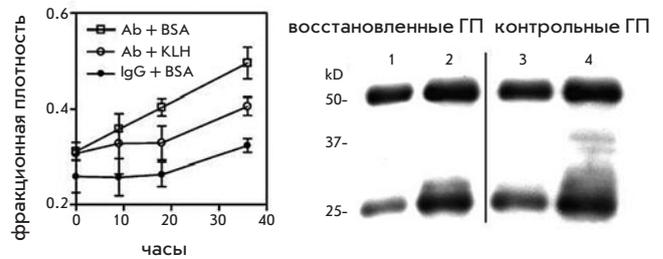
**Рис. 3.** Ковалентно-связывающая ELISA. Антитела, полученные против конъюгата пирувата и KLH (анти-2 KLH) или против немодифицированного KLH, специфично реагировали (по данным ELISA) с пируватом (2), конъюгированным с BSA (столбцы с заливкой). Связывание с химически восстановленным пируват-BSA (незалитые столбцы) наблюдалось в случае анти-2 KLH антител, но не в случае анти-KLH антител. Нормальные, неиммунные IgG плохо связывались с обеими молекулами. Мы предположили, что это связывание основано на реакции ковалентного связывания карбонильной группы пирувата с анти-KLH антителами. Титр – 1/разведение  $\times 10^3$

могла бы привести к увеличению популяции карбонил-реактивных антител. В более раннем исследовании, используя иммунодетекцию, мы показали, что антитела, индуцированные в ответ на пируват-гаптен, конъюгированный с гемоцианином миноги (KLH), могут связывать антиген, опознавая только его карбонильную группировку в составе гаптена [21]. При этом большая часть анти-KLH антител была представлена антителами, реагирующими с карбонилом. Антитела к KLH связывались с реактивным пируватом таким же образом, что было показано с помощью дифференциального связывания с восстановленным гаптен (рис. 3). Предполагается, что это точечное связывание обусловлено образованием ковалентных аддуктов с основанием Шиффа в результате взаимодействия антитела и пируватного остатка. Для проверки способности этих антител реагировать также и с карбонильными группами продуктов гликирования мы сравнили скорость образования аддукта при использовании анти-KLH IgG и нормальных IgG в реакции с гликированными пептидами из сыворотки крыс, страдающих диабетом. Оказалось, что легкие цепи антител против KLH реагируют лучше нормального IgG [22]. По всей видимости, за это взаимодействие ответственны именно карбонильные группы, поскольку химически восстановленные пептиды не образовывали ковалентных аддуктов (рис. 4). Протеомный анализ продуктов, полученных из легких цепей, с помощью масс-спектрометрии показал,

что основные пептиды переменных районов легких цепей происходили из легких цепей типа лямбда, несмотря на то что более 90 % IgG крысы имеет легкие цепи каппа. Кроме того, легкие цепи лямбда, как оказалось, имели последовательности, идентичные неперестроенным переменным районам зародышевой линии [22]. Эти результаты замечательны в том отношении, что они указывают на возможность повышения реактивности легких цепей с помощью соматических мутаций. Несмотря на то что масс-спектрометрический анализ обнаружил только пептиды немутированных районов легких цепей, мало представленные легкие цепи с модифицированными остатками или другими мутациями могли остаться незамеченными в ходе протеомного анализа. Альтернативное объяснение состоит в том, что легкие цепи с природной реактивностью могут рекрутироваться совместно с переменными районами тяжелых цепей, обуславливая специфичность к KLH и гликированным пептидам.

**РЕАКТИВНЫЕ АНТИТЕЛА СМЯГЧАЮТ ПАТОЛОГИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ГЛИКИРОВАНИЯ**

Возможность блокирования образования AGE-продуктов развитием реактивного иммунного ответа *in vivo* была продемонстрирована на крысах с стрептозотоцин-индуцированным диабетом, при котором развитие диабетической нефропатии коррелирует с гликированием белков. По сравнению с животными, иммунизированными чистым адьювантом, KLH-иммунизированные крысы имели значительно сниженный уровень AGE-продуктов, который коррелировал со снижением нефропатии [22]. Улучшенная функция почек определялась по морфологии клубочков и уровню протеинурии, а также гистологически, по уменьшению уровня AGE-продуктов в почечной ткани. Мы предполагаем, что такой терапевтический эффект может быть связан с захватом циркулирующих продуктов гликирова-



**Рис. 4.** Реакция анти-KLH антител с гликированными пептидами (ГП) в сыворотке больных диабетом. (Правая панель) Плотность полос, соответствующих продуктам с весом около 30 – 34 kDa, визуализированных методом SDS-PAGE и последующим иммуноблотом нанесена как доля от общей плотности легких цепей. Образование легких цепей с большей массой было отмечено при реакции антител из нормальных и KLH-иммунизированных крыс. Скорость последней реакции снижалась в присутствии KLH. (Левая панель) Реакция легких цепей с гликопептидами из сыворотки диабетических крыс в нулевой точке времени (дорожки 1 и 3) и после 24 часов (дорожки 2 и 4). Гликопептиды, восстановленные с помощью боргидрида натрия, за это время не прореагировали (дорожки 1 и 2), в то время как необработанные гликопептиды образовывали аддукты с легкими цепями весом около 30 – 34 kDa (дорожки 3 и 4)

ния реактивными антителами. Этот механизм предполагает, что гликирование самих иммуноглобулинов имеет меньший патогенный эффект, чем гликирование других белков. Гликированные антитела образуются у больных диабетом, и накопление легких цепей в сыворотке [19] указывает на то, что эти молекулы играют роль в патогенезе, вызванном AGE. Более того, гликированные IgG более эффективно удаляются из циркуляции, чем немодифицированные IgG [23]. Также было предложено, что существенные отличия в удалении различных гликированных молекул имеют место только в почечной ткани. Модифицированные легкие цепи также удаляются через почки, поскольку они обнаруживаются в моче и у здоровых, и у больных диабетом [24, 25]. Фильтрационные свойства низкомолекулярных гликированных белков также могут способствовать их избирательному удалению [26]. Таким образом, эти данные могут указывать на роль молекул иммуноглобулинов в удалении продуктов гликирования путем селективного поглощения и удаления в почках. Эти свойства, возможно, говорят о положительной роли молекул иммуноглобулинов в противодействии токсическому эффекту неферментативного гликирования.

Данные исследования также показывают, что способность антител к образованию ковалентных связей усиливается адаптивным иммунитетом. Отсутствие разнообразия в ковалентно-связывающихся легких цепях, зарегистрированное масс-спектрометрией, указывает на то, что AGE-реактивность кодируется генами зародышевой линии [22]. Однако этот метод не позволяет идентифицировать конкретные места, где произошла модификация, которые могут быть связаны с реактивными аминокислотами, меняющими последовательность прототипа. Считается, что гликозилированные остатки КЛН отвечают за кросс-реактивность анти-КЛН антител с углеводными эпитопами *Cryptococcus neoformans* [27]. Таким же образом реактивность анти-КЛН антител в отношении гликозилированных эпитопов опухолей может объяснять терапевтический эффект КЛН при карциноме мочевого пузыря [28]. И так же гликан-специфический ответ может объяснять специфическое реагирование анти-КЛН антител с гликированными пептидами. Эта специфичность может быть закодирована тяжелой цепью или может осуществляться естественным антителом, индуцированным КЛН, действующим в качестве суперантигена. Это интересные вопросы, заслуживающие дальнейшего исследования.

### ПОЛУЧЕНИЕ КОВАЛЕНТНО-СВЯЗЫВАЮЩИХСЯ АНТИТЕЛ С ПОМОЩЬЮ РЕАКТИВНОЙ СЕЛЕКЦИИ И РЕАКТИВНОЙ ИММУНИЗАЦИИ

В дальнейших исследованиях мы использовали синтетические субстраты в качестве реактивных антигенов для поиска антител, способных образовывать ковалентные связи. Эта работа была основана на предположении, что антитела, которые селективировались по нуклеофильности в отношении химически-реактивного субстрата, также могли проявлять ферментативную активность посредством ковалентного катализа. Небольшой фосфорорганический (ОР) эфир использовался в качестве зонда селекции при изучении библиотеки фагового дисплея одноцепочечных VH-VL фрагментов на предмет необратимого ковалентного связывания [29]. Среди селективированных клонов несколько ковалентно связывали субстрат. Оказалось, что все эти ковалентно-связывающиеся Fv молекулы реагируют своими VL цепями и могут быть описаны двумя каноническими последовательностями. Более реактивный клон A.17 использовал VL продукт зародышевой линии DPL-5, который был фосфорилирован по остатку Tyr37, находящемуся в каркасном районе FR-L2. Напротив, остальные реактивные клоны использовали продукт зародышевой VL линии DPL-3 и реагировали по Tyr32 в районе CDR-L1. Эти нуклеофильные остатки тирозина, которые консервативны в зародышевой линии, в трехмерной структуре оба могут ориентироваться так, чтобы контактировать с антигеном в центре связывания. Однако структурные модели также указывают на то, что нуклеофильный Tyr37 в участке контакта между VL и VH доменами в A.17 может быть стерически недоступен для связывания с лигандом без существенных конформационных изменений (рис. 5). Поскольку библиотека была создана путем случайного комбинирования фрагментов генов VL и VH, мы не ожидали найти природных пар в scFv. Однако VH цепи реактивных клонов были в основном представлены высокотопологичными последовательностями семейства VH4. В общем, весьма вероятно, что тяжелая цепь играет очень важную роль в реактивности Fv. Было показано, что Fv может связывать структурно неродственные фосфорорганические соединения, в т.ч. реактивные нейро-соединения, что говорит об отсутствии строгой специфичности к лиганду. В ходе изучения способности A.17 Fv к каталитической активности была продемонстрирована слабая гидролитическая активность по отношению к пептидным амидам и простым карбоксильным эфирам в ка-

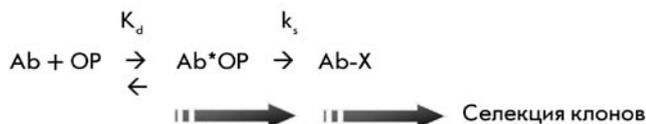


Рис. 5. Молекулярные модели переменных участков Fv фрагментов ковалентно-связывающихся антител. Желтым цветом обозначены нуклеофильные боковые цепи тирозина, участвующие в нуклеофильной атаке фосфорорганического реагента. Тирозин в сайте VL32 на модели A.5 является частью CDR1, расположенного близко к поверхности Fv домена, в то время как тирозин в сайте VL37 в A.17 находится в FR1 на стыке между VL и VH. Эта модель предполагает консервативный активный центр в глубокой впадине в A.17

честве субстратов. Таким образом, вариабельный район иммуноглобулинов по всей видимости служит в качестве примитивного ковалентного катализатора. Особенно интересно то, что активные центры такого катализатора могут быть закодированы парами VL-VH, которые присутствуют в геноме зародышевой линии. Дальнейшее изучение моноклональных фрагментов имеет большое значение, поскольку эти структуры могут помочь выяснить происхождение и биохимические функции химической реактивности вариабельных доменов.

Методы химической селекции *in vitro* могут повторять процессы первого этапа адаптивного ответа при реактивной иммунизации. Однако вклад необратимого ковалентного связывания в селекцию клонов *in vivo* еще до конца не выяснен. Используя реактивный фосфорорганический эфир (ОР) в качестве антигена и наш метод анализа ковалентного связывания, мы изучили возможность получения иммунного ответа в виде антител, изменяющихся в результате взаимодействия с антигеном. Мыши, которых иммунизировали фосфорорганическим эфиром, конъюгированным с белком-носителем, продуцировали антитела IgG, которые можно было детектировать прямо в сыворотке по их реакции с биотинилированным фосфорорганическим соединением [21]. Удивительным образом, эти поликлональные антитела модифицировались в основном по легким цепям. Оказалось, что эта активность усиливается созреванием афинности. Это позволяет предположить, что реактивные легкие цепи можно селективировать при адаптивном ответе. Однако, неясно, влияло ли ковалентное связывание с легкими цепями на эту афинность, или она просто обусловлена нековалентным связыванием. Если описать данную задачу как ферментативную систему, то скорость модификации (ковалентного захвата антигена) должна возрастать при уменьшении  $K_d$ . Нековалентного связывания, выраженного как  $K_d$  комплекса Михаелиса  $Ab^*OP$  (Антитело\*ОР) должно быть достаточно для созревания афинности. Однако последующее необратимое ковалентное связывание, модифицирующее антитело ( $Ab-X$ ), может обеспечивать кинетическую селекцию для клональной экспансии В клеток путем увеличения скорости  $k_s$  (схема). В конечном счете вопрос состоит в том, играет ли ковалентный захват антигена какую-то естественную роль в иммунитете или в защите организма-хозяина.

#### Схема



#### ХИМИЗМ ОБРАЗУЮЩИХСЯ В РЕЗУЛЬТАТЕ ОКИСЛЕНИЯ КАРБОНИЛЬНЫХ ЭПИТОПОВ ДЛЯ ПРИРОДНЫХ АНТИТЕЛ

Известно, что nAbs, кодируемые генами зародышевой линии, могут связываться с консервативными детерминантами на патогенах, также называемыми PAMPs (pathogen-associated molecular patterns – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны). IgM nAbs в основном продуцируются популяциями долгоживущих и самовозобновляющихся В-клеток, в том числе фракциями В-1 и В-1а

[5]. Считается, что этот В-клеточный репертуар был сохранен в ходе эволюции, поскольку он выполняет функции защиты организма-хозяина [6]. Недавно было показано, что nAbs также могут связывать измененные эпитопы апоптотических клеток и собственных белков [30]. Эти данные подтверждают концепцию гомеостатической функции nAbs, обеспечивающей выведение дебриса, возникающего при смерти клеток, и продуктов распада белков [6, 31]. Таким образом, химические структуры, которые образуются при окислении и гликооксидации фосфолипидов мембраны, являются естественными мишенями для связывания nAbs, что указывает на еще один случай, в котором карбонильная природа боковых групп может быть связана с иммунными механизмами. Взаимодействие с фосфорилхолиновой (РС) головкой окисленных фосфолипидов и РС остатками на полисахаридах бактериальной клеточной стенки указывает на общую молекулярную детерминанту для иммунной и гомеостатической функций nAbs [7]. В качестве молекулярного рецептора PAMPs вариабельный район nAb может считаться родственным эволюционно-консервативному Toll-like рецептору (TLR), участвующему во врожденном иммунитете [32]. Эта парадигма получает все новые подтверждения и имеет далеко идущие последствия для понимания связи между врожденным и адаптивным иммунитетом.

Окисленные фосфолипиды, которые накапливаются в атеросклеротических повреждениях, служат мишенями и для врожденного, и для адаптивного иммунитета [33]. Роль реактивной кислородной группировки в формировании эпитопов для nAb или соматически модифицированных антител продолжает исследоваться. Окисление *syn*-2 ненасыщенных цепей жирных кислот, входящих в состав фосфолипидов, приводит к образованию реактивных, в том числе и альдегидных, групп в составе липидных молекул. Одна гипотеза утверждает, что карбонильные группы служат реактивными якорями для модификации собственных белков фосфолипидными остатками. Небольшие альдегиды, в том числе 4-гидроксиноненал и 4-гидроксигексенал, образующиеся при перекисном окислении липидов, также участвуют в повреждении белков и цитотоксичности, что говорит о возможной роли в аутоиммунном ответе [34]. Более того, малондиальдегид, гликоальдегид и другие реактивные альдегиды, образующиеся при неполном гликировании, вызывают модификацию LDL и продукцию аутоантител в патологических случаях [35]. Взаимодействие небольших альдегидов с остатками на поверхности белков, в том числе с боковыми цепями лизина и гистидина, часто используется для объяснения возникновения неозпитопов для аутоантител, происходящих из популяции nAbs. Например, было показано, что гистициновые аддукты альдегидов, образующиеся при окислении липидов, вызывают образование антител, которые также связывают ДНК. Эти антитела демонстрируют высокий уровень гомологии аминокислотной последовательности с природными аутоантителами против ДНК, а также родство с nAbs [36]. Было предложено, что связывание ДНК происходит за счет структурной мимикрии между гистидин-альдегидными аддуктами и 2-дезоксирибонуклеозидами. Таким образом, роль карбонильных остатков в формировании иммунного ответа на измененные соединения организма-хозяина

может иметь несколько уровней. В общем случае сайты на собственных белках, модифицированные ди- или трикарбонным альдегидом или другими реактивными веществами, часто служат лигандами для рецепторов врожденного иммунитета, например для сквенджер-рецептора макрофагов и RAGE. Хотя в ранних исследованиях и рассматривалось ковалентное связывание альдегид-модифицированных белков со сквенджер-рецепторами через основание Шиффа, карбиноламин или другие аддукты [37], такие взаимодействия с этими или другими рецепторами врожденного иммунитета и в особенности с паратопами антител до сих пор не показаны.

### **ХИМИЧЕСКАЯ РЕАКТИВНОСТЬ, КАТАЛИЗ И ПРИРОДА ПОЛИРЕАКТИВНЫХ АНТИТЕЛ**

Полиреактивностью nAbs называется нестрогая специфичность связывания мультвалентных молекул IgM с самыми разнообразными молекулами, например с внутриклеточными белками и нуклеиновыми кислотами [38]. Такая способность к связыванию, которую также можно называть аутореактивностью к собственным молекулам, до сих пор плохо осмыслена в структурном отношении. Повышенная avidность, обусловленная распознаванием повторяющихся структур на собственных молекулах или мембранах, является правдоподобным механизмом для полиреактивности. В рамках этой концепции повторяющиеся структуры могли бы служить особой формой молекулярной поверхности, идентифицирующей поврежденные ткани или собственные измененные антигены. Так, высокая плотность PC групп на окисленных фосфолипидах и полисахаридах клеточных стенок представляет собой общий сигнал для связывания nAb с апоптотическими клетками и с инфекционными агентами. Сходным образом, фосфатные цепочки или последовательности нуклеотидов ДНК могут служить паттерном распознавания для ДНК-распознающих антител, связывающих остатки ядра поврежденных клеток [39, 40].

Сообщения, демонстрирующие, что аутоантитела к ДНК, встречающиеся при волчанке и других аутоиммунных заболеваниях, имеют фосфодиэстеразную активность, служат дополнительным примером того, как распознавание молекул переменными районами Ig осуществляется с помощью химической реактивности [41]. Эти антитела используют аминокислотные остатки, расположенные в сайтах связывания, для катализа гидролитического расщепления ДНК лигандов. Удивительное свойство ДНК-гидролизующих аутоантител – это их зависимость от ионов металлов, что делает их похожими на обычные ДНКазы [42, 43]. Несмотря на это, ферментоподобные антитела не демонстрируют особой специфичности к нуклеотидной последовательности и неспецифично гидролизуют одноцепочечные и двуцепочечные ДНК [42, 44]. Структурные исследования указывают на то, что каталитический сайт для гидролиза ДНК может быть закодирован в переменном районе легкой цепи в конфигурации, близкой к зародышевой [44]. Новые исследования показывают, что мутации в переменных районах легких и тяжелых цепей, которые улучшают связывание с ДНК, также могут улучшать гидролитическую активность [42]. Твердо установлено, что IgG аутоантитела против ДНК сильно диверсифицируются при помощи процессов антиген-

направленного адаптивного иммунитета [45, 46]. Например, положительно заряженные остатки лизина и аргинина в сайте связывания повышают сродство к отрицательно заряженной молекуле ДНК. Однако появление этих остатков может быть связано с изменением предпочтительности использования VH или VL генов зародышевой линии [47, 48]. Данные кристаллографических исследований говорят о том, что ДНК-связывающие аутоантитела взаимодействуют с ДНК посредством стандартного сайта связывания, состоящего из CDR петель [49, 50]. Мутации в VL и VH областях приводят к введению остатков, содействующих непосредственному контакту с антигеном или изменяющих конформацию молекулы, что косвенно улучшает комплементарность. Несмотря на это, онтогенез ДНК аутоантител также может отражать врожденную способность nAbs к связыванию ДНК. Распознавание ДНК может происходить напрямую из распознавания природных антителами PC групп, что подтверждается приобретением способности к связыванию ДНК и потерей способности к связыванию PC в результате точечной мутации в моноклональном мышине nAb T15 [51]. Более ранние исследования также показали, что ДНК-связывающие аутоантитела проявляют ограниченное использование VH генов [52] и могут целиком кодироваться зародышевыми V генами без каких-либо соматических изменений [53–55]. Предполагается, что реактивность переменных районов, закодированных в зародышевой линии, также может объяснять протеолитическую активность природных аутоантител [56]. В целом эти данные подкрепляют гипотезу о том, что каталитические активности переменных районов Ig существуют в качестве врожденной и естественной функции иммуноглобулинов. Тот факт, что каталитическая активность аутоантител в основном работает с пептидными или олигонуклеотидными субстратами, делает менее выраженным различие между врожденным и адаптивным иммунитетом, поскольку эти субстраты могут вступать в глубокое взаимодействие с обычным антиген-связывающим участком и предполагаемыми реактивными сайтами. Соответственно, специфичность к модификациям собственных антигенов говорит о том, что вовлечен адаптивный иммунитет, однако нестрогая специфичность к структурам субстрата, фланкирующим место гидролиза, предполагает неспецифическую реактивность примитивного активного сайта. Более подробные биохимические и структурные исследования реактивных или каталитических сайтов nAbs должны прояснить биологическое значение этой новой функции.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Ковалентно-связывающиеся антитела, полученные с помощью иммунизации или реактивной селекции, а также каталитические антитела, образующиеся при аутоиммунных патологиях, по всей видимости, имеют много общего с nAbs. Например, это распознавание сходных молекулярных функциональных групп, таких как реактивные карбонильные и фосфорные группы, образовавшиеся в результате окисления, а также сохранение VH и VL районов в конфигурации, близкой к зародышевой. Эти черты могут быть связаны на самом глубоком уровне, поскольку логично предположить, что и химическая, и ферментативная реактивность – это признаки, подвергавшиеся активному и дол-

гому отбору, и поэтому сохраненные в репертуаре V генов. В то время как nAbs – это IgM, которые распознают молекулярные паттерны на белках и клеточных стенках с помощью мультивалентного связывания, реактивные и природные каталитические антитела являются IgG. При всем этом слабое нековалентное связывание обычно также является атрибутом ферментативного катализа. В процессе катализа, по теории переходного состояния, самое сильное взаимодействие происходит между ферментом и продуктом реакции переходного состояния. В ковалентном комплексе связывание по большей части происходит за счет химической связи между остатком в активном центре фермента и функциональной группой лиганда. То, что nAbs связываются множеством слабых взаимодействий с небольшими, минимально измененными эпитопами, хорошо согласуется с распознаванием функциональности субстрата для дальнейшей реакции. Таким образом, химическая реактивность может служить механизмом для перехода от слабого нековалентного связывания к прочному связыванию или каталитической активности. Физиологическая роль реактивных и каталитических антител должна быть полнее осмыслена, учитывая то, что их роль в иммунитете и гомеостазе постепенно начинает проясняться. Участие nAbs в ответе на окислительный стресс и в разборке продуктов апоптоза говорит о том, что эта жизненно важная роль в поддержании гомеостаза могла существовать еще до возникновения адаптивного иммунитета. Те же соображения могут быть применимы к ковалентно-связывающимся антителам,

которые служат для защиты от гликемического стресса. Возникновение реактивных и каталитических функций антител в адаптивных и аутоиммунных ответах может объясняться реальной биологической ролью или дефектом регулирования иммунитета. Тот факт, что продукцию таких антител можно индуцировать с помощью адаптивного иммунитета, дает возможность вызвать благотворный защитный ответ на окислительный или гликоокислительный стресс. С другой стороны, роль природных каталитических аутоантител остается неясной, а их существование может просто свидетельствовать о нарушении переключения репертуара V генов при индукции IgG аутоантител [57, 58]. Получение каталитических антител с заданными свойствами возможно с помощью адаптивного иммунного ответа в результате процесса созревания аффинности, увеличивающей реактивность к субстрату или связывание с промежуточным продуктом реакции. В какой степени каталитические антитела с заданными свойствами имитируют функции природных каталитических аутоантител? Важные данные о такой возможности были получены в раннем исследовании, которое показало высокий уровень гидролитической активности в моноклональных антителах аутоиммунного репертуара [59]. Дальнейшие исследования ковалентной реактивности антител, получаемых при иммунизации или обнаруженных в зародышевом репертуаре, должны привести к более глубокому пониманию полезной или патологической роли этого необычного и нового свойства антител, и дать ему техническое применение. ●

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lerner R.A., Benkovic S.J., Schultz P.G.// At the crossroads of chemistry and immunology: catalytic antibodies. *Science*. 1991. 252. 659–667.
- Wagner J., Lerner R.A., Barbas C.F. 1 Efficient aldolase catalytic antibodies that use the enamine mechanism of natural enzymes// *Science*. 1995. 270. 1797–1800.
- Zhu X., Tanaka F., Hu Y., Heine A., Fuller R., Zhong G., Olson A.J., Lerner R.A., Barbas C.F., Wilson I.A. The origin of enantioselectivity in aldolase antibodies: crystal structure, site-directed mutagenesis, and computational analysis// *J Mol Biol*. 2004. 343. 1269–1280.
- Chou M.Y., Fogelstrand L., Hartvigsen K., Hansen L.F., Woelkers D., Shaw P.X., Choi J., Perkmann T., Backhed F., Miller Y.I. et al.// Oxidation-specific epitopes are dominant targets of innate natural antibodies in mice and humans. 2009.119. 1335–1349.
- Kearney J.F. Innate-like B cells.// *Springer Semin Immunopathol*. 2005. 26. 377–383.
- Lutz H.U., Binder C.J., Kaveri S. Naturally occurring auto-antibodies in homeostasis and disease// *Trends Immunol*. 2005. 30. 43–51.
- Briles D.E., Forman C., Hudak S., Claflin J.L.// Anti-phosphorylcholine antibodies of the T15 idiotype are optimally protective against *Streptococcus pneumoniae*. *J Exp Med*. 1982. 156. 1177–1185.
- Vlassara H., Palace M.R.// Diabetes and advanced glycation endproducts. *J Intern Med*. 2002. 251. 87–101.
- Brownlee M.// Glycation products and the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Care*. 1992. 15. 1835–1843.
- Cerami A., Vlassara H., Brownlee M.// Role of advanced glycosylation products in complications of diabetes. 1988. 11 Suppl 1. 73–79.
- Saito A., Nagai R., Tanuma A., Hama H., Cho K., Takeda T., Yoshida Y., Toda T., Shimizu F., Horiuchi S. et al.// Role of megalin in endocytosis of advanced glycation end products: implications for a novel protein binding to both megalin and advanced glycation end products. *J Am Soc Nephrol*. 2003. 14. 1123–1131.
- Zhu W., Sano H., Nagai R., Fukuhara K., Miyazaki A., Horiuchi S.// The role of galectin-3 in endocytosis of advanced glycation end products and modified low density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001. 280. 1183–1188.
- Vlassara H. //The AGE-receptor in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Metab Res Rev*. 2001. 17. 436–443.
- Pricci F., Leto G., Amadio L., Iacobini C., Romeo G., Cordone S., Gradini R., Barsotti P., Liu F.T., Di Mario U. et al.// Role of galectin-3 as a receptor for advanced glycosylation end products. *Kidney Int Suppl*. 2000. 77. S31–39.
- Smedsrod B., Melkko J., Araki N., Sano H., Horiuchi S.// Advanced glycation end products are eliminated by scavenger-receptor-mediated endocytosis in hepatic sinusoidal Kupffer and endothelial cells. *Biochem J*. 1997. 322 ( Pt 2). 567–573.
- Vasan S., Foiles P.G., Founds H.W.// Therapeutic potential of AGE inhibitors and breakers of AGE protein cross-links. *Expert Opin Investig Drugs*. 2001. 10. 1977–1987.
- Bucciarelli L.G., Wendt T., Qu W., Lu Y., Lalla E., Rong L.L., Goova M.T., Moser B., Kislinger T., Lee D.C. et al.// RAGE blockade stabilizes established atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-null mice. *Circulation*. 2002. 106. 2827–2835.
- Soulis-Liparota T., Cooper M., Papazoglou D., Clarke B., Jerums G.// Retardation by aminoguanidine of development of albuminuria, mesangial expansion, and tissue fluorescence in streptozotocin-induced diabetic rat. *Diabetes*. 1991. 40. 1328–1334.
- Mitsuhashi T., Li Y.M., Fishbane S., Vlassara H.// Depletion of reactive advanced glycation endproducts from diabetic uremic sera using a lysozyme-linked matrix. *J Clin Invest*. 1997. 100. 847–854.
- Gugliucci A., Menini T.// Circulating advanced glycation peptides in streptozotocin-induced diabetic rats: evidence for preferential modification of IgG light chains. *Life Sci*. 1998. 62. 2141–2150.
- Armentano F., Knight T., Makker S., Tramontano A.// Induction of covalent binding antibodies. *Immunol Lett*. 2006. 103. 51–57.
- Shcheglova T., Makker S., Tramontano A.// Reactive immunization suppresses advanced glycation and mitigates diabetic nephropathy. 2009. 20. 1012–1019.
- Kennedy D.M., Skillen A.W., Self C.H.// Glycation increases the vascular clearance rate of IgG in mice. *Clin Exp Immunol*. 1993. 94. 447–451.
- Groop L., Makiperna A., Stenman S., DeFronzo R.A., Teppo A.M.// Urinary excretion of k light chains in patients with diabetes mellitus. *Kidney Int*. 1990. 37. 1120–1125.
- Hutchison C.A., Harding S., Hewins P., Mead G.P., Townsend J., Bradwell A.R., Cockwell P. 2008. Quantitative assessment of serum and urinary polyclonal free light chains in patients with chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008. 3. 1684–1690.
- Kowluru A., Kowluru R.A.// Preferential excretion of glycated albumin in C57BL-

- Ks-J mice: effects of diabetes. *Experientia*. 1992. 48. 486–488.
27. May R.J., Beenhouwer D.O., Scharff M.D.// Antibodies to keyhole limpet hemocyanin cross-react with an epitope on the polysaccharide capsule of *Cryptococcus neoformans* and other carbohydrates: implications for vaccine development. *J Immunol*. 2003. 171. 4905–4912.
  28. Harris J.R., Markl J.// Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review. *Micron*. 1999. 30. 597–623.
  29. Reshetnyak A.V., Armentano M.F., Ponomarenko N.A., Vizzuso D., Durova O.M., Ziganshin R., Serebryakova M., Govorun V., Gololobov G., Morse H.C. et al.// Routes to covalent catalysis by reactive selection for nascent protein nucleophiles. *J Am Chem Soc*. 2007. 129. 16175–16182.
  30. Shaw P.X., Goodyear C.S., Chang M.K., Witztum J.L., Silverman G.J.// The autoreactivity of anti-phosphorylcholine antibodies for atherosclerosis-associated neo-antigens and apoptotic cells. *J Immunol*. 2003. 170. 6151–6157.
  31. Quartier F., Potter P.K., Ehrenstein M.R., Walport M.J., Botto M.// Predominant role of IgM-dependent activation of the classical pathway in the clearance of dying cells by murine bone marrow-derived macrophages in vitro. *Eur J Immunol*. 2005. 35. 252–260.
  32. Pasare C., Medzhitov R.// Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Adv Exp Med Biol*. 2005. 560. 11–18.
  33. Binder C.J., Shaw P.X., Chang M.K., Boullier A., Hartvigsen K., Horkko S., Miller Y.I., Woelkers D.A., Corr M., Witztum J.L.// The role of natural antibodies in atherogenesis. *J Lipid Res*. 2005. 46. 1353–1363.
  34. Toyoda K., Nagae R., Akagawa M., Ishino K., Shibata T., Ito S., Shibata N., Yamamoto T., Kobayashi M., Takasaki Y. et al.// Protein-bound 4-hydroxy-2-nonenal: an endogenous triggering antigen of anti-DNA response. *J Biol Chem*. 2007. 282. 25769–25778.
  35. Younis N., Sharma R., Soran H., Charlton-Menys V., Elseweidy M., Durrington P.N.// Glycation as an atherogenic modification of LDL. *Curr Opin Lipidol*. 2008. 19. 378–384.
  36. Akagawa M., Ito S., Toyoda K., Ishii Y., Tatsuda E., Shibata T., Yamaguchi S., Kawai Y., Ishino K., Kishi Y. et al.// Bispecific abs against modified protein and DNA with oxidized lipids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006. 103. 6160–6165.
  37. Horiuchi S., Murakami M., Takata K., Morino Y.// Scavenger receptor for aldehyde-modified proteins. *J Biol Chem*. 1986. 261. 4962–4966.
  38. Zhou Z.H., Tzioufas A.G., Notkins A.L.// Properties and function of polyreactive antibodies and polyreactive antigen-binding B cells. *J Autoimmun*. 2007. 29. 219–228.
  39. Kawarada Y., Miura N., Sugiyama T.// Antibody against single-stranded DNA useful for detecting apoptotic cells recognizes hexadeoxynucleotides with various base sequences. *J Biochem*. 1998. 123. 492–498.
  40. Frankfurt O.S., Robb J.A., Sugarbaker E.V., Villa L.// Monoclonal antibody to single-stranded DNA is a specific and sensitive cellular marker of apoptosis. *Exp Cell Res*. 1996. 226. 387–397.
  41. Shuster A.M., Gololobov G.V., Kvashuk O.A., Bogomolova A.E., Smirnov I.V., Gabibov A.G.// DNA hydrolyzing autoantibodies. *Science*. 1992. 256. 665–667.
  42. Kim Y.R., Kim J.S., Lee S.H., Lee W.R., Sohn J.N., Chung Y.C., Shim H.K., Lee S.C., Kwon M.H., Kim, Y.S.// Heavy and light chain variable single domains of an anti-DNA binding antibody hydrolyze both double- and single-stranded DNAs without sequence specificity. *J Biol Chem*. 2006. 281. 15287–15295.
  43. Gololobov G.V., Chernova E.A., Schourov D.V., Smirnov I.V., Kudelina I.A., Gabibov A.G.// Cleavage of supercoiled plasmid DNA by autoantibody Fab fragment: application of the flow linear dichroism technique. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995. 92. 254–257.
  44. Gololobov G.V., Rumbley C.A., Rumbley J.N., Schourov D.V., Makarevich O.I., Gabibov A.G., Voss E.W., Jr., Rodkey L.S.// DNA hydrolysis by monoclonal anti-ssDNA autoantibody BV 04-01: origins of catalytic activity. *Mol Immunol*. 1997. 34. 1083–1093.
  45. Wellmann U., Letz M., Herrmann M., Angermuller S., Kalden J.R., Winkler T.H.// The evolution of human anti-double-stranded DNA autoantibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005. 102. 9258–9263.
  46. Demaison C., Chastagner P., Theze J., Zouali M.// Somatic diversification in the heavy chain variable region genes expressed by human autoantibodies bearing a lupus-associated nephritogenic anti-DNA idiotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994. 91. 514–518.
  47. Harada T., Suzuki N., Mizushima Y., Sakane T.// Usage of a novel class of germ-line Ig variable region gene for cationic anti-DNA autoantibodies in human lupus nephritis and its role for the development of the disease. *J Immunol*. 1994. 153. 4806–4815.
  48. O'Keefe T.L., Datta S.K., Imanishi-Kari T.// Cationic residues in pathogenic anti-DNA autoantibodies arise by mutations of a germ-line gene that belongs to a large VH gene subfamily. *Eur J Immunol*. 1992. 22. 619–624.
  49. Tanner J.J., Komissarov A.A., Deutscher S.L.// Crystal structure of an antigen-binding fragment bound to single-stranded DNA. *J Mol Biol*. 2001. 314. 807–822.
  50. Herron J.N., He X.M., Ballard D.W., Blier P.R., Pace P.E., Bothwell A.L., Voss E.W., Jr., Edmundson A.B.// An autoantibody to single-stranded DNA: comparison of the three-dimensional structures of the unliganded Fab and a deoxynucleotide-Fab complex. *Proteins*. 1991. 11. 159–175.
  51. Giusti A.M., Chien N.C., Zack D.J., Shin S.U., Scharff, M.D.// Somatic diversification of S107 from an antiphosphocholine to an anti-DNA autoantibody is due to a single base change in its heavy chain variable region. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987. 84. 2926–2930.
  52. Kieber-Emmons T., von Feldt J.M., Godillot A.P., McCallus D., Srikantan V., Weiner D.B., and Williams W.V.// Isolated VH4 heavy chain variable regions bind DNA: characterization of a recombinant antibody heavy chain library derived from patient(s) with active SLE. *Lupus*. 1994. 3. 379–392.
  53. Siminovitch K.A., Chen P.P.// The biologic significance of human natural autoimmune responses: relationship to the germline, early immune and malignant B cell variable gene repertoire. *Int Rev Immunol*. 1990. 5. 265–277.
  54. Siminovitch K.A., Misener V., Kwong P.C., Song Q.L., Chen P.P.// A natural autoantibody is encoded by germline heavy and lambda light chain variable region genes without somatic mutation. *J Clin Invest*. 1989. 84. 1675–1678.
  55. Sanz I., Dang H., Takei M., Talal N., Capra J.D.// VH sequence of a human anti-Sm autoantibody. Evidence that autoantibodies can be unmutated copies of germline genes. *J Immunol*. 1989. 142. 883–887.
  56. Planque S., Bangale Y., Song X.T., Karle S., Taguchi H., Poindexter B., Bick R., Edmundson A., Nishiyama Y., Paul S.// Ontogeny of proteolytic immunity: IgM serine proteases. *J Biol Chem*. 2004. 279. 14024–14032.
  57. Matejuk A., Beardall M., Xu Y., Tian Q., Phillips D., Alabyev B., Mannoor K., Chen C.// Exclusion of natural autoantibody-producing B cells from IgG memory B cell compartment during T cell-dependent immune responses. *J Immunol*. 2009. 182. 7634–7643.
  58. Brown M., Schumacher M.A., Wiens G.D., Brennan R.G., Rittenberg M.B.// The structural basis of repertoire shift in an immune response to phosphocholine. *J Exp Med*. 2000. 191. 2101–2112.
  59. Tawfik D.S., Chap R., Green B.S., Sela M., Eshhar Z. Unexpectedly high occurrence of catalytic antibodies in MRL/lpr and SJL mice immunized with a transition-state analog: is there a linkage to autoimmunity? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995. 92. 2145–2149.

УДК 577.29

# Изменение уровня экспрессии генов в процессе перехода клеток *M. tuberculosis* в состояние «некультивируемости»

Е.Г. Салина<sup>1\*</sup>, Х. Молленкопф<sup>2</sup>, С. Кауфман<sup>2</sup>, А.С. Капрельянц<sup>1</sup><sup>1</sup> Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33<sup>2</sup> Институт инфекционной биологии им. М. Планка, 10117, Берлин, Шуманштрассе, 21-22

\*E-mail: elenasalina@mail.ru

**РЕФЕРАТ** Был проведен анализ изменения уровня экспрессии генов при обратимом переходе клеток *M. tuberculosis* в «некультивируемое» (НК) состояние в длительной стационарной фазе в специально подобранных условиях. Обнаружено, что более чем для 500 генов наблюдалось изменение уровня экспрессии, 238 генов имели повышенный уровень экспрессии во всех рассматриваемых точках при переходе в НК состояние. Почти четвертую часть генов с повышенным уровнем экспрессии составляют гены группы инсерционных элементов и фаговых белков, что, возможно, иллюстрирует высокую интенсивность процессов модификации генома *M. tuberculosis* при образовании НК клеток. Помимо значительного числа генов с невыявленной функцией, среди генов с повышенной экспрессией оказалось достаточно много генов, продукты которых принимают участие в основных метаболических процессах и дыхании, в регуляции транскрипции и процессах, протекающих в клеточной стенке, а также кодирующих регуляторные белки. Полученные результаты позволяют нам предполагать, что переход клеток в покоящееся состояние является активным процессом, в который вовлечено множество генов, участвующих в различных метаболических процессах. Детальный анализ экспериментальных данных в последующем может быть полезен для понимания молекулярных механизмов явления латентности туберкулезной инфекции и покоя *M. tuberculosis*. Суммируя результаты транскриптомного анализа НК клеток, получаемых в нашей модели, и данные, полученные исследователями в ряде других моделей персистенции *M. tuberculosis*, можно выявить ряд «общих» для всех моделей генов, активирующихся в данных условиях. Тринадцать генов с повышенной экспрессией, общие для ряда моделей персистенции, могут быть рассмотрены как потенциальные мишени для создания новых противотуберкулезных лекарственных средств, направленных, прежде всего, против латентного туберкулеза.

**Ключевые слова:** *M. tuberculosis*, латентный туберкулез, «некультивируемые» клетки, глобальный профиль экспрессии генов.

## ВВЕДЕНИЕ

Возбудитель туберкулеза бактерия *Mycobacterium tuberculosis* может персистировать в организме человека в течение десятилетий после инфицирования. Подобное латентное состояние *M. tuberculosis* традиционно связывают с переходом клеток возбудителя в покоящееся состояние, сопровождающееся потерей их культивируемости [1]. Именно поэтому латентную инфекцию практически не-

возможно выявить стандартными биохимическими и микробиологическими методами, а также устранить с помощью антибиотикотерапии. Для изучения особенностей латентной инфекции в живых организмах используют различные модификации экспериментальной модели покоящегося состояния *M. tuberculosis* в условиях гипоксии in vitro [2, 3], однако все они не имитируют такое важное состояние бактерий, как их «некультивируемость»

в состоянии покоя. Нам удалось разработать модель, в которой покоящиеся клетки *M. tuberculosis* являются «некультивируемыми» (НК) и способны к реактивации в определенных условиях [4].

С целью выявления особенностей биохимических процессов, связанных с переходом бактерий в состояние «некультивируемости», и понимания механизмов данного явления нами был проведен анализ изменения профиля экспрессии генов *M. tuberculosis* в процессе образования НК форм.

**МЕТОДЫ**

Образцы тотальной РНК *M. tuberculosis* были выделены из клеток в конце логарифмической фазы роста культуры (5 дней культивирования) и при переходе в НК состояние при инкубации в стационарной фазе в различных временных точках (21, 30, 41 и 62 дней культивирования) по методу, опубликованному ранее [5]. Комплементарная ДНК была получена с использованием 1 мкг РНК, случайных праймеров-гексамеров и обратной транскриптазы (Superscript III, Invitrogen) в соответствии с руководством фирмы-производителя; в кДНК, соответствующую клеткам, взятым в различные временные точки стационарной фазы, была введена флюоресцентная метка Су-3, для кДНК, соответствующей клеткам логарифмической фазы роста и использующейся в качестве контроля – Су-5. Далее 250 ng Су3-меченной кДНК были конкурентно гибридизованы с таким же количеством Су5-меченной кДНК контрольного образца на стеклянных подложках с нанесенными на них матрицами с продуктами ген-специфичной ПЦР-амплификации генома *M. tuberculosis* (SurePrint technology, Agilent). Гибридизация проводилась в двух повторностях при 42 °С в течение 20 ч в соответствии с рекомендациями изготовителя, после чего была проведена трехкратная отмывка слайдов буфером I (Ambion) при 55 °С с последующим их сканированием с разрешением 10 мкм (Microarray Scanner BA, Agilent). Анализ полученных результатов проводился с помощью программы Agilent’s feature extraction software version.

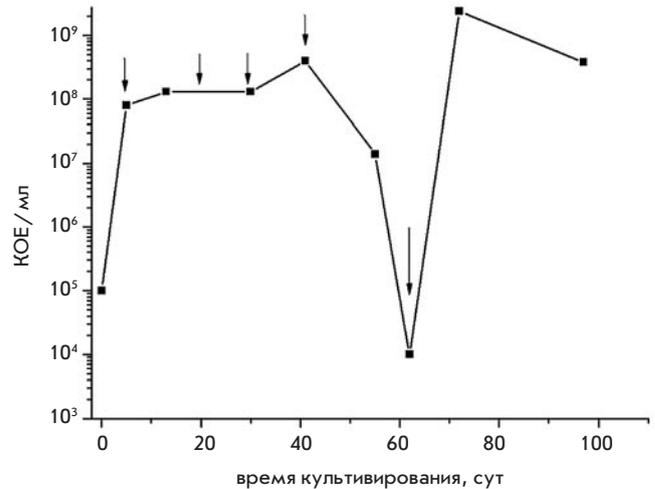


Рис. 1. Образование НК клеток *M. tuberculosis* в стационарной фазе. Стрелками отмечены временные точки, в которых производилось выделение РНК из клеток

(Agilent). Для обработки результатов изменения профиля экспрессии генов был использован критерий 1,5, к рассмотрению принимались результаты, дающие согласованный результат в двух повторностях и удовлетворяющие условиям Т-теста.

**РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Ранее нами было обнаружено, что культивирование *M. tuberculosis* на не содержащей ионов калия среде Sauton с добавлением глюкозы, БСА и хлорида натрия приводило к снижению способности клеток образовывать колонии на твердой среде при росте в стационарной фазе [4]. Через 60 дней культивирования число КОЕ в мл среды снижалось до 10<sup>5</sup> (рис. 1), что означало переход 99.9 % клеток в культу-

Таблица 1. Функциональные категории генов *M. tuberculosis*, обладающих измененным уровнем экспрессии при переходе в состояние «некультивируемости»

Функциональные категории	Гены, индуцирующиеся при переходе в НК состоянии		Гены, репрессирующиеся при переходе в НК состоянии		% доля в геноме
	Число генов	% доля	Число генов	% доля	
Вирулентность, детоксификация, адаптация	5	2.1	7	2.9	2.6
Метаболизм липидов	6	2.5	20	8.4	5.9
Регуляция транскрипции и трансляции	13	5.5	23	9.7	5.8
Процессы, связанные с клеточной стенкой	24	10.1	59	24.8	18.8
Инсерционные элементы и фаговые белки	58	24.4	1	0.4	3.7
Пролин-глутамат богатые белки (PE/PPE)	7	2.9	11	4.6	4.2
Основные метаболические процессы, в т.ч. дыхание	42	17.7	50	21.1	22.4
Регуляторные белки	16	6.7	4	1.7	4.8
Белки с невыясненной функцией	67	28.1	63	26.5	31.9
Всего генов	238	–	237	–	3924

Таблица 2. Гены, имеющие значительно повышенный уровень экспрессии при переходе в НК состояние в стационарной фазе

ORF	Ген	Белковый продукт	Изменение уровня экспрессии гена				
			5 дней	21 день	30 дней	41 день	62 дня
Rv0186	<i>bglS</i>	Бета-глюкозидаза	1	4.20459	8.33686	6.51867	5.24295
Rv0840c	<i>pip</i>	Пролин-иминопептидаза	1	6.33559	11.0004	4.58881	3.86572
Rv0841c		Трансмембранный белок	1	31.11093	52.56174	13.79488	11.85425
Rv0989c	<i>grcC2</i>	Полипиренил-дифосфатсинтаза	1	7.60797	6.29748	7.58723	3.94285
Rv0990c		Гипотетический белок	1	7.12899	6.60915	6.652	3.57343
Rv0991c		Консервативный гипотетический белок	1	3.31598	3.87521	5.44297	3.70462
Rv1369c		Транспозаза	1	3.17178	3.9213	4.22925	3.86883
Rv1394c	<i>cyp132</i>	Цитохром P 450 132	1	8.89047	7.50161	3.72981	3.12534
Rv1395		Белок-регулятор транскрипции	1	3.22394	11.65875	7.03908	4.27327
Rv1397c		Консервативный гипотетический белок	1	6.95276	11.79184	5.97336	5.77752
Rv1460		Белок-регулятор транскрипции	1	3.87617	5.50637	6.90405	3.78332
Rv1575		Фаговый белок phiRV1	1	17.29509	37.08693	51.7473	20.53329
Rv1576c		»	1	28.17817	33.97652	10.11378	12.88182
Rv1577c		»	1	26.27261	39.87495	19.41512	11.49041
Rv1584c		»	1	3.27674	5.68552	3.3055	3.02886
Rv1831		Гипотетический белок	1	3.1468	5.74692	5.14019	4.04747
Rv1991c		Консервативный гипотетический белок	1	4.04696	4.12618	4.06786	4.65579
Rv1992c	<i>ctpG</i>	АТФаза, транспортирующая катионы металлов	1	5.2883	7.31348	4.7442	4.22806
Rv2106		Транспозаза	1	3.01418	5.61324	4.77882	5.09925
Rv2254c		Интегральный мембранный белок	1	7.09534	6.53956	3.33899	4.63885
Rv2278		Транспозаза	1	3.28663	6.78129	6.28036	4.13102
Rv2354		»	1	3.1594	6.15299	5.21098	3.13151
Rv2497c	<i>pdhA</i>	Альфа-субъединица пируватдегидрогеназы	1	3.73133	4.52197	5.04976	4.00306
Rv2642		Регулятор транскрипции семейства ArsR	1	3.76985	5.16757	4.39006	3.93426
Rv2644c		Гипотетический белок	1	3.36059	7.58921	5.36796	3.51825
Rv2645		»	1	3.45006	8.21393	6.70101	3.25709
Rv2646		Интеграза	1	5.04391	12.16535	7.82435	9.96087
Rv2647		Гипотетический белок	1	5.32983	13.40623	9.43796	7.2163
Rv2649		Транспозаза IS6110	1	3.2505	5.3557	5.59089	3.74714
Rv2650c		Профаговый белок phiRv2	1	21.46669	29.74372	16.65359	20.66349
Rv2651c		Профаговая протеаза phiRv2	1	20.04086	34.29153	20.61728	13.41666
Rv2660c		Гипотетический белок	1	13.43717	41.25793	67.29882	19.6699
Rv2661c		»	1	9.23174	28.30861	52.34967	11.04351
Rv2662		»	1	20.62942	18.83647	14.72059	12.88898
Rv2663		»	1	7.61461	9.43216	8.19525	7.3034
Rv2664		»	1	6.24636	8.49102	7.10191	5.60291
Rv2666		Трункированная транспозаза IS1081	1	6.91867	13.89339	7.89331	5.86579
Rv2667	<i>clpC2</i>	АТФ-зависимая протеаза	1	9.44815	17.89662	9.64508	6.46149
Rv2707		Консервативный трансмембранный белок	1	3.35002	5.09024	14.83903	4.53239
Rv2711	<i>ideR</i>	Белок-регулятор транскрипции	1	3.48877	4.30099	6.06795	3.83858
Rv2713	<i>sthA</i>	Растворимая пиридин-нуклеотид трансгидрогеназа	1	4.43327	6.35516	6.80833	3.83838
Rv2780	<i>ald</i>	Секретируемая L-аланин дегидрогеназа ALD	1	5.2891	4.65988	4.52694	4.92656
Rv2814c		Транспозаза	1	3.3279	5.52338	4.86873	4.60102
Rv2815c		»	1	3.13667	6.24306	5.87423	4.84337
Rv3185		»	1	3.58899	6.43621	5.67335	5.82686
Rv3186		»	1	3.2903	6.21375	6.14822	5.77427
Rv3290c	<i>lat</i>	L-лизин аминотрансфераза	1	4.32023	5.06387	3.54801	3.9704
Rv3474		Транспозаза IS6110	1	3.04947	6.19754	6.19869	3.22266
Rv3475		»	1	3.73966	5.79892	5.63617	6.23465
Rv3580c	<i>cysS</i>	Цистеинил – tPHK синтетаза	1	3.87797	6.67899	3.14124	3.40852
Rv3582c	<i>ispD</i>	2-С-метил-D-эритритол-4-фосфат цитидилл-трансфераза	1	3.50012	4.07861	3.78626	3.51221

ре в НК состоянии. При продолжении культивирования НК клеток в стационарной фазе наблюдался самопроизвольный возврат их способности образовывать колонии. Важно отметить обратимость состояния «некультивируемости» – полученные НК клетки, взятые из точки с минимальным числом КОЕ, могли быть реактивированы при пересеве их на свежую среду роста.

Сравнение профиля экспрессии генов бактериальной популяции в различных точках стационарной фазы относительно логарифмической фазы роста культуры (5 дней культивирования) выявило изменение уровня экспрессии генов в 1.5 и более раз для достаточно значительного числа генов – 566, что составляет более 14 % от всего генома *M. tuberculosis*. Среди данного количества генов с изменен-

ной экспрессией 238 генов имели повышенный уровень экспрессии и 237 генов имели сниженный уровень экспрессии при культивировании в стационарной фазе во всех рассматриваемых точках. В табл. 1 представлено распределение генов с измененным при переходе в НК состояние уровнем экспрессии в соответствии с функциональной принадлежностью кодируемых ими продуктов.

Помимо большой группы генов с невыявленной функцией, кодирующих т.н. гипотетические белки, снижен уровень экспрессии для многих генов – участников основных метаболических процессов. Также значительно снижен уровень экспрессии генов, вовлеченных в вирулентность и адаптацию, метаболизм липидов, регуляцию транскрипции и трансляции и процессы, протекающие в клеточной стенке.

При рассмотрении генов, уровень экспрессии которых повышается при переходе в НК состояние, также обнаружилось присутствие значительного числа генов с невыявленной функцией; однако обращает на себя внимание тот факт, что почти четвертую часть генов с повышенным уровнем экспрессии составляют гены из группы инсерционных элементов и фаговых белков, тогда как действительная доля их в геноме невелика – всего 3.7 %. Данный факт, возможно, иллюстрирует высокую интенсивность процессов, приводящих к модификации генома *M. tuberculosis* при переходе клеток в НК состояние.

Среди генов с повышенной экспрессией оказалось достаточно много генов, продукты которых принимают участие в основных метаболических процессах, в частности *gcvB* и *ald*, кодирующие соответственно глицин-дегидрогеназу и L-аланин-дегидрогеназу, протеиназы *repR* и *clpC2*. Повышен уровень экспрессии одного из генов, кодирующих изоцитратлиазу *icl1* – анаплеротический фермент, присутствующий в клетках *M. tuberculosis* в виде двух изоформ – *icl 1* и *icl 2*. Изоцитратлиаза является одним из ключевых ферментов глиоксилатного шунта – метаболического пути, альтернативного циклу трикарбоновых кислот, позволяющего производить синтез углеводов из простых предшественников. В частности, он активно функционирует в прорастающих семенах, когда жирные кислоты являются основным источником углерода и энергии. Индукция ряда генов, участвующих в процессах деградации липидов *fadD9*, *fadE24*, *fadE26* и жирных кислот *scoA*, указывает на активное функционирование глиоксилатного шунта в НК клетках. Функционирование глиоксилатного шунта ранее было отмечено для модели персистенции *M. tuberculosis* Вейна [2].

При переходе в НК состояние происходит также индукция ряда генов, являющихся своеобразными маркерами стрессовых условий: белка теплового шока *hsp*, шаперонов Rv0440 и Rv3417c, а также сигма-факторов: *sigG* – регулирующего гены, необходимые для выживания внутри макрофагов, и *sigB*, который может контролировать регулоны стационарной фазы и общую устойчивость к стрессам. Индукция генов *cssA*, продукт которого принимает участие в биосинтезе цитохромов на стадии включения гема и *sup132*, кодирующего один из цитохромов P-450, окисляющих различные ксенобиотики, скорее всего, указывает на возможность накопления в культуре токсичных компонентов. Также в НК клетках индуцируются гены, ко-

дирующие ферменты немевалонатного пути синтеза изопреноидов *ispF*, *ispD*. Есть данные о том, что некоторые метаболиты этого пути могут влиять на иммунный ответ организма-хозяина [6]. Среди индуцированных при переходе в состояние «некультивируемости» генов достаточно велика доля генов, продукты которых принимают участие в процессах регуляции транскрипции, и кодирующих регуляторные белки, в частности белок-регулятор транскрипции *furA*, осуществляющий негативный контроль транскрипции путем связывания оператора репрессируемых генов с помощью катиона железа. Предполагается, что данный белок осуществляет контроль транскрипции гена *katG*, уровень транскрипции которого в НК состоянии также повышен. Данный ген кодирует многофункциональный фермент, проявляющий каталазную, пероксидазную и пероксинитразную активности, и, как предполагается, может играть роль в процессе внутриклеточного выживания микобактерий в макрофагах, защищая их от агрессивных компонентов, продуцируемых клетками-фагоцитами. Активируются гены, принимающие участие в процессах, протекающих в клеточной стенке, в частности, различных транспортеров – *ctpG* и *ctpC*, кодирующих АТФазы, транспортирующие катионы металлов, а также Rv2688c – транспортера, осуществляющего экспорт антибиотиков из клетки и отвечающий за резистентность к ним.

С целью выявить гены, уровень экспрессии которых значительно повышен при переходе в НК состояние, мы ввели более жесткий критерий – уровень экспрессии гена во всех рассматриваемых точках стационарной фазы превышает его экспрессию по сравнению с 5 сут роста в 3 и более раз. Таким условиям отвечает 51 ген (табл. 2).

Среди генов со значительно повышенным уровнем экспрессии лидирующие позиции – 20 генов из 51 – занимают гены, кодирующие инсерционные элементы и фаговые белки, 13 генов кодируют белки с невыявленной функцией. Об-

Таблица 3. Сопоставление генов, имеющих повышенный (более 1.5) уровень экспрессии при переходе в НК состояние в стационарной фазе, с генами, активирующимися в ряде других моделей персистенции

Модели персистенции <i>M. tuberculosis</i>	Совпадение с 238 генами, активирующимися в стационарной фазе при переходе в НК состояние	
	Число генов	% доля
Нерепликативное состояние Вейна (Voskuil et al., 2004)	23	9.7
Персистенция при лимитировании источника углерода в условиях 50 %-ного насыщения кислородом (Hampshire et al., 2004)	82	34.5
Персистенция при инфицировании макрофагов (Schnappinger et al., 2003)	77	32.4
Модель искусственной гранулемы мышей (Karakousis et al., 2004)	32	13.4
Длительный ответ на гипоксию (Rustad et al., 2008)	40	16.8

Таблица 4. «Универсальные» гены персистирующего состояния *M. tuberculosis*. Жирным шрифтом выделены гены, входящие в состав EHR регулона

ORF	Ген	Нереплекатив-ное состояние Вейна (Voskuil et al., 2004)	Лимитирование источника углерода (Hampshire et al., 2004)	Персистенция в макрофагах (Schnappinger et al., 2003)	Искусственная гранулема мышей (Karakousis et al., 2004)	НК состояние в стационарной фазе
Rv0188		0.8	67.2	2.8	2.7	2.5
Rv0211	<i>pckA</i>	-	1.7	3.6	2.6	1.64
Rv0251c	<i>hsp</i>	4.5	18.6	25.6	3.9	4.5
Rv1894c		2.0	5.1	1.8	-	2.8
Rv1909c	<i>furA</i>	-	5.4	2.2	2.8	2.7
Rv2011c		2.1	9.5	2.5	-	2.8
Rv2497c	<i>pdhA</i>	3.4	8.4	2.1	2.0	4.0
Rv2660c		1.5	4.3	2.1	3.3	19.7
Rv2662		1.5	1.5	2.0	-	12.9
Rv2710	<i>sigB</i>	-	34.6	3.8	4.7	4.6
Rv2780	<i>ald</i>	6.1	2.6	2.4	2.4	4.9
Rv3139	<i>fadE24</i>	-	2.2	2.0	5.8	2.4
Rv3290c	<i>lat</i>	3.6	25.9	7.5	5.6	4.0

ращает на себя внимание факт, что значительно повышенным уровнем экспрессии отличаются те гены – участники основных метаболических процессов, белковые продукты которых кодируют участие в процессах деградации, в частности *bglS* – бета-глюкозидаза (гидролизует концевой остаток бета-глюкозы), *pip* – пролиниминопептидаза (специфически катализирует удаление N-концевого пролина у коротких пептидов), *clpC2* – АТФ-зависимая протеаза, *ald* – L-аланин-дегидрогеназа (катализирует гидролиз аланина – важного компонента пептидогликанового слоя с образованием пирувата). При этом повышенной экспрессией отличается ген *pdhA*, кодирующий альфа-субъединицу пируват-дегидрогеназы, участвующей в энергетическом метаболизме клеток и катализирующей конверсию пирувата в ацетил-КоА. На преобладание катаболических процессов в метаболизме клеток в НК состоянии указывает и значительно повышенный уровень экспрессии *sthA* – растворимой пиридин-нуклеотид трансгидрогеназы, осуществляющей конверсию НАДРН, образующейся в катаболических путях, в НАДН, необходимый в дыхательной цепи для генерирования энергии.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ВЫВОДЫ

Анализ глобального профиля экспрессии генов был проведен для ряда моделей персистенции *M. tuberculosis*, в частности модели нерепликативного состояния Вейна в условиях гипоксии [5, 7, 8], модели персистенции в условиях лимитирования по источнику углерода в условиях сниженной концентрации кислорода [9], при инфицировании макрофагов [10], и *in vivo* при образовании искусственной гранулемы у мышей [11]. При рассмотрении результатов, полученных этими исследователями, оказалось, что профиль экспрессии генов в изучаемой нами модели «некультивируемости» в стационарной фазе имеет ряд совпадений с моделями персистенции, указанными выше (табл. 3).

Менее всего общего было найдено при сопоставлении генов, активирующихся в модели «некультивируемости»,

разработанной нами, и модели покоя в условиях гипоксии Вейна (табл. 3). Известно, что модель Вейна отличается индукцией генов так называемого Dos-регулона (от *Dormancy survival regulator*) – группы из 49 генов, находящейся под контролем *devR*, кодирующего регуляторную часть двухкомпонентной системы. Повышенный уровень транскрипции генов *M. tuberculosis* в составе Dos-регулона наблюдался не только у покоящихся в условиях гипоксии *in vitro* клеток, но также при инфицировании макрофагов [10] и в модели искусственной гранулемы мышей [11]. В разработанной нами модели перехода *M. tuberculosis* в НК состояние в стационарной фазе среди генов с повышенной экспрессией были обнаружены только 2 гена Dos-регулона – Rv0571c и Rv2631. Индукции генов Dos-регулона не было обнаружено у клеток, персистирующих в условиях голодания [12], а в модели персистенции при истощении источника углерода активировались только два гена этого регулона [9].

В недавно опубликованной работе [13] было продемонстрировано, что роль Dos-регулона не только как универсального регулятора покоящегося состояния микобактерий, но даже как универсального ответа на состояние гипоксии, по-видимому, переоценена. Показано, что гены Dos-регулона максимально активируются только в первые 2 ч после наступления гипоксии, затем экспрессия по крайней мере половины из них возвращается на исходный уровень [13]. Те же авторы показали, что далее при культивировании в условиях гипоксии через 4 дня наблюдается повышение уровня экспрессии ряда генов количеством около 230, и их уровень остается стабильным в дальнейшем. Эту группу генов авторы назвали EHR (*Enduring hypoxia response* – длительный ответ на гипоксию). При рассмотрении изменения профиля экспрессии генов при переходе в НК состояние в модели, разработанной нами, было выявлено достаточно много совпадений с этой группой генов (табл. 3), что явилось несколько неожиданным фактом, поскольку разработанные нами условия образования НК

клеток не подразумевали никакой лимитации по кислороду. При рассмотрении генов, активирующихся в модели персистенции в условиях истощения источника углерода [9] и модели ответа на множественные стрессовые факторы [14], также обнаружилось перекрывание с генами EHR [13]. Таким образом, можно сделать вывод, что гены EHR могут не только претендовать на роль маркеров гипоксии, но и представлять собой регулон покоящегося состояния микобактерий туберкулеза в целом, независимо от путей индукции такого состояния.

Таким образом, приведенные данные свидетельствуют о том, что переход клеток в покоящееся состояние является активным процессом, в который вовлечены десятки генов. Задачей дальнейших исследований является подробное изучение этого процесса для понимания молеку-

лярных механизмов, протекающих в клетке при переходе в состояние покоя.

Суммируя результаты транскриптомного анализа НК клеток, получаемых в нашей модели, и данные, полученные исследователями в ряде моделей персистенции, можно выявить ряд общих для всех моделей генов, активирующихся в данных условиях (*табл. 4*). Мы полагаем, что гены, перечисленные в *табл. 4*, и их продукты могут быть рассмотрены и подробно изучены в дальнейшем с целью создания новых противотуберкулезных лекарственных средств, направленных прежде всего против латентного туберкулеза. ●

*Работа поддержана программой Президиума РАН  
«Молекулярная и клеточная биология».*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gangadharam P.R.J. // *Tuber. Lung Dis.* 1995. 76. 477–479.
2. Wayne L.G., Lin K.-Y. // *Infect. Immun.* 1982. 37. 1042–1049.
3. Wayne L.G., Hayes L.G. // *Infect. Immun.* 1996. 64. 2062–2069.
4. Mukamolova G.V., Salina E.G., Kaprelyants A.C. // *National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH (Georgiev, V., ed), Humana Press, USA.* 2008. 1. 83–90.
5. Voskuil M.I., Visconti K.C., Schoolnik G.K. // *Tuberculosis (Edinb.)*, 2004. 84. 218–227.
6. Shao L., Zhang W., Zhang S., Chen C.Y., Jiang W., Xu Y., Meng C., Weng X., Chen Z.W. // *AIDS.* 2008. 22(17). 2241–2508.
7. Muttucumaru D.G., Roberts G., Hinds J., Stabler R.A., Parish T. // *Tuberculosis (Edinb.)*. 2004. 84. 239–246.
8. Bacon J., James B.W., Wernisch L., Williams A., Morley K.A., Hatch G.J., Mangan J.A., Hinds J., Stoker N.G., Butcher P.D., Marsh P.D. // *Tuberculosis (Edinb.)*. 2004. 84. 205–217.
9. Hampshire T., Soneji S., Bacon J., James B. W., Hinds J., Laing K., Stabler R. A., Marsh P.D., Butcher P.D. // *Tuberculosis (Edinb.)*. 2004. 84. 228–238.
10. Schnappinger D., Ehrt S., Voskuil M.I., Liu Y., Mangan J.A., Monahan I.M., Dolganov G., Efron B., Butcher P.D., Nathan C., Schoolnik G.K. // *J. Exp. Med.* 2003. 198(5). 693–704.
11. Karakousis P.C., Yoshimatsu T., Lamichhane G., Woolwine S.C., Nuermberger E.L., Grosset J., Bishai W.R. // *J. Exp. Med.* 2004. 200. 647–657.
12. Betts J.C., Lukey P.T., Robb L.C., McAdam R.A., Duncan K. // *Mol. Microbiol.* 2002. 43. 717–731.
13. Rustad T.R., Harrell M.I., Liao R., Sherman D.R. // *PLoS ONE.* 2008. 3(1). 1502.
14. Boshoff H.I., Myers T.G., Copp B.R., McNeil M.R., Wilson M.A., Barry C.E. 3rd // *J. Biol. Chem.* 2004. 279. 40174–40184.

УДК 577.151.45

# Сравнительное изучение каталитических характеристик интеграз пенообразующего вируса человека и ВИЧ-1

Е.С. Княжанская<sup>1</sup>, М.А. Смолов<sup>2</sup>, О.В. Кондрашина<sup>2</sup>, М.Б. Готтих<sup>3\*</sup><sup>1</sup> Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 73, ГСП-1, МГУ<sup>2</sup> Химический факультет МГУ, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3, ГСП-1, МГУ<sup>3</sup> Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, 119899, Москва, Ленинские горы, МГУ, НИИФХБ

E-mail: gottikh@libro.belozersky.msu.ru

**РЕФЕРАТ** Ретровирусы являются потенциальной базой при создании векторов генной терапии благодаря их способности интегрироваться в геном клетки-хозяина. Интеграцию вирусного генома осуществляет вирусный фермент интегразы, поэтому для разработки подходов к направленной интеграции ДНК требуется детальное изучение этого фермента. В данной работе были исследованы каталитические характеристики интегразы пенообразующего вируса человека. Этот вирус принадлежит к семейству ретровирусов, но при этом не является патогенным. Была определена константа диссоциации, а также исследована кинетика каталитической активности интегразы. Полученные результаты были сравнены с результатами, ранее полученными для интегразы вируса иммунодефицита человека, и было выявлено значительное сходство в работе двух ферментов.

**Ключевые слова:** ВИЧ (вирус иммунодефицита человека), ПВЧ (пенообразующий вирус человека), HFV (human foamy virus), интегразы, каталитическая активность.

Благодаря своей способности интегрироваться в геном неделящихся клеток, ретровирусы активно используются как база для создания генно-терапевтических векторов. В ряде работ [1–6] описаны системы, использующие интегразу вируса иммунодефицита человека первого типа (ИН ВИЧ-1) как основу для соз-

дания конструкций, способных интегрировать определенный вектор в заданную последовательность ДНК. Однако векторы направленной интеграции на основе ВИЧ несут в себе потенциальную опасность для здоровья человека в силу его высокой патогенности. В связи с этим привлекательным является пенообразующий вирус человека (Hu-

man foamy virus – HFV), который эффективно заражает клетки человека [7], но при этом не является патогенным. HFV относится к подгруппе *Sputaviridae* семейства ретровирусов и имеет фермент интегразу (ИН HFV), осуществляющий интеграцию вирусного генома в клеточный. На настоящий момент каталитические свойства ИН HFV изучены достаточно слабо. В данной работе предпринята попытка изучить каталитические свойства ИН HFV и сравнить их свойства со свойствами ИН ВИЧ-1, для того чтобы оценить возможность использования интегразы HFV для направленной интеграции.

Одной из причин, затрудняющих изучение каталитических свойств ретровирусных интеграз, является их низкая активность: для осуществления 3'-процессинга необходим очень высокий избыток фермента по отношению к ДНК (обычно > 30 : 1). Поэтому изучение свойств ИН HFV мы начали с исследования зависимости эффективности 3'-процессинга от концентрации фермента в реакционной смеси. Для этого использовались синтетические ДНК-дуплексы, имитирующие концевую последовательность U5-домена длинного концевого повтора вирусной ДНК. При инкубации ИН с таким ДНК-субстратом происходит отщепление динуклеотида с 3'-конца процессируемой цепи (U5В-цепь). Для обеих ИН наибольшая эффективность реакции достигалась при 100 нМ концентрации фермента (рис. 1). Низкая ферментативная активность ИН ВИЧ объясняется однооборотным механизмом каталитического процесса, одной из причин которого является образование прочного комплекса фермента с последовательностью ДНК [8]. В связи с этим следующим этапом изучения свойств ИН HFV стало исследование стадии связывания ДНК.

Для определения константы диссоциации комплекса ИН HFV – ДНК мы изучали связывание 2 или 10 нМ ДНК-субстрата при различных концентрациях фермента (рис. 2а). В приближении исследуемой системы к теории простого лиганд-рецепторного взаимодействия по уравнению (1)

$$[IN * DNA] = \frac{1}{2} \left( [DNA]_0 + [IN]_0 + K_d^{-1} - \sqrt{([DNA]_0 + [IN]_0 + K_d^{-1})^2 - 4 \times [DNA]_0 \times [IN]_0} \right) \quad (1)$$

было рассчитано значение  $K_d$ , которое соответствовало 15–20 нМ. Это значение свидетельствует о формировании несколько более прочного комплекса ДНК с ИН HFV, чем с ИН ВИЧ (40 нМ [8]).

Мы также изучили кинетику связывания ДНК обоими ферментами методом поляризации флуоресценции. Эксперимент осуществлялся при 25 °С, поскольку известно, что в данных условиях ретровирусные ИН способны связывать свой субстрат, не осуществляя его процессинг. При добавлении к флуоресцентно меченному ДНК-дуплексу раствора ИН наблюдалось резкое увеличение анизотропии флуоресцентного сигнала, обусловленное более медленным вращением комплекса (рис. 2б). Процесс формирования комплекса ДНК с ИН HFV полностью завершается за 3–4 мин, что примерно в 5 раз превышает время, необходимое для связывания ДНК ИН ВИЧ [8]. Этот факт также

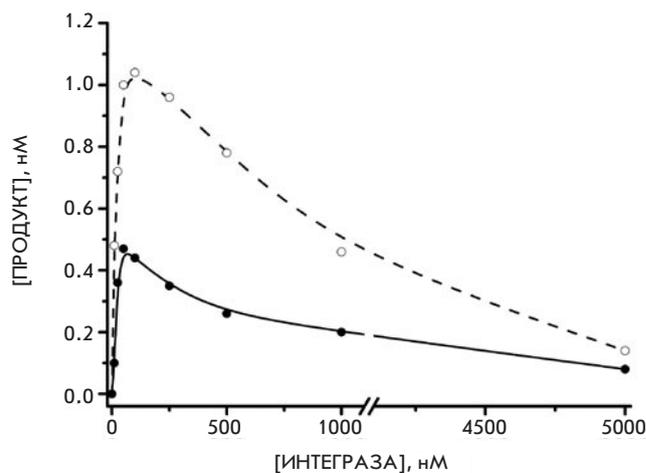


Рис. 1. Влияние концентрации интегразы ВИЧ-1 (белые кружки) и HFV (черные кружки) на выход продукта 3'-процессинга. Раствор интегразы (5 нМ–5 мкМ) инкубировался с 4 нМ ДНК-субстратом в течение 1 ч при 37 °С

свидетельствует в пользу большего предпочтения ИН HFV к связыванию ДНК-субстрата.

Полученные результаты хорошо согласуются с данными по зависимости накопления продуктов каталитического превращения ДНК-субстрата от времени. На рис. 3 представлены кривые, соответствующие накоплению суммы продуктов реакций 3'-процессинга и переноса цепи, катализируемых двумя ИН.

Можно видеть, что лаг-фаза, предшествующая фазе линейного накопления продуктов, характерная для функционирования ИН ВИЧ, полностью отсутствует в случае ИН HFV. Вместо этого процесс сразу переходит в фазу линейного роста. Рассчитанные значения стационарных скоростей образования продуктов на этой стадии имеют близкие значения для обеих интеграз ( $V_{\text{linear}}$  (ВИЧ) = 0.011 нмоль/мин,  $V_{\text{linear}}$  (HFV) = 0.014 нмоль/мин) и являются чрезвычайно низкими, что нехарактерно для многооборотного режима функционирования ферментов при рассматриваемых концентрациях. Вместе с тем показано, что причиной подобного поведения ИН ВИЧ, выделяемой в присутствии ионов цинка и в отсутствии детергентов по методике [9], является ее низкая природная каталитическая активность, а не низкое содержание активной формы белка в используемых препаратах. Это приводит к тому, что для описания каталитической активности ИН ВИЧ классический формализм Михаэлиса-Ментен оказывается неприменим. Вместо этого приходится использовать кинетические уравнения с допущением, что реакции, катализируемые ИН, протекают в т.н. «условиях одного оборота», подразумевающих использование большого избытка фермента по отношению к субстрату [8]. Такое же допущение было использовано нами и в случае ИН HFV. Определенное в однооборотном приближении значение аналога каталитической константы оказалось практически

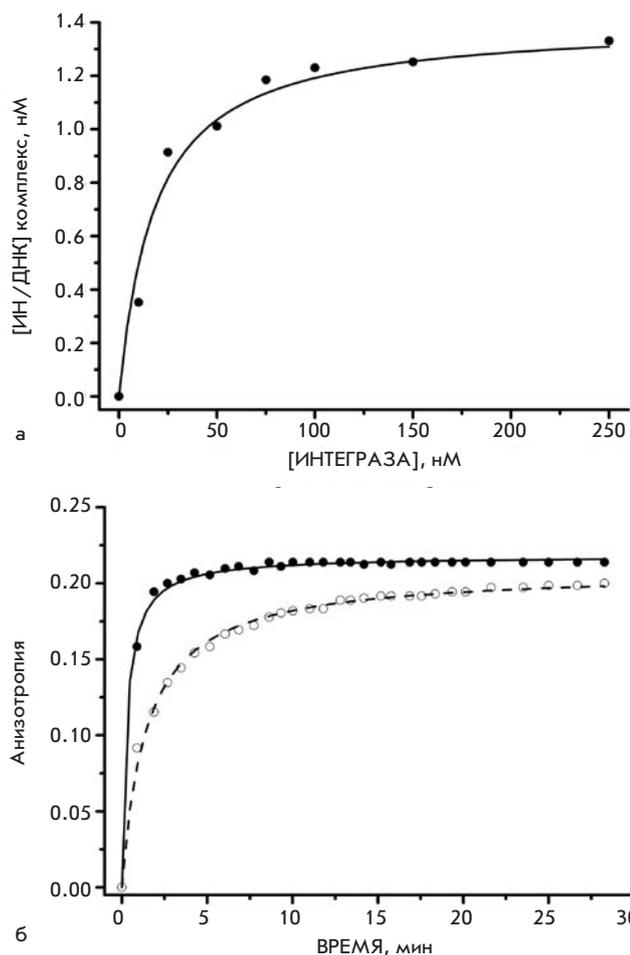


Рис. 2. Связывание ДНК с ИН ВИЧ и ИН HFV: а – изотерма связывания ИН HFV 2 нМ U5-HFV-субстрата. Инкубация проводилась в течение 20 мин при 25 °С в буферном растворе, содержащем 20 мМ Tris (рН 7.2), 20 мМ NaCl, 1 мМ DTT и 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, затем ДНК-белковые комплексы анализировались методом «торможения» в геле; б – кинетика связывания 4 нМ ДНК 100 нМ ИН ВИЧ-1 (белые кружки) и ИН HFV (черные кружки) при 25 °С, исследованная методом поляризации флуоресценции

одинаково для обоих ферментов ( $k_{cat}' = 0.004 \pm 0.001 \text{ мин}^{-1}$ ), что также указывает на близкие свойства обоих интеграз. Вместе с тем надо отметить, что рассчитанное по кинетическим данным значение аналога константы Михаэлиса для ИН ВИЧ ( $K_m = 30 \pm 5 \text{ нМ}$ ) хорошо согласуется со значением константы диссоциации комплекса ИН ВИЧ-ДНК ( $K_d = 40 \text{ нМ}$ ). В то же время для ИН HFV такого соответствия не наблюдается. Рассчитанное нами  $K_m' = 60 \pm 10 \text{ нМ}$  плохо согласуется с определенной величиной  $K_d$  (15–20 нМ). В дальнейшем мы планируем изучить причины этого несоответствия.

В результате проделанной работы нам удалось показать, что ИН HFV по своим кинетическим характеристикам близка к ИН ВИЧ-1. В ближайшее время мы планируем использовать этот фермент для создания системы направленной интеграции ДНК.

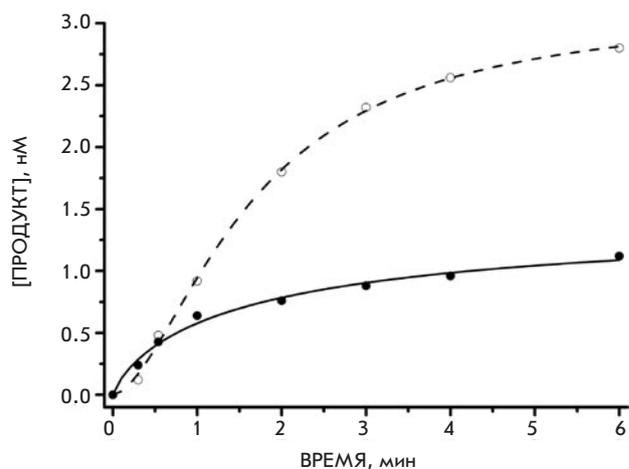


Рис. 3. Кинетика реакции 3'-процессинга. Кривая накопления продукта 3'-процессинга 4 нМ U5-субстрата при инкубации со 100 нМ ИН ВИЧ-1 (белые кружки) и ИН HFV (черные кружки)

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Олигонуклеотиды, U5B-ВИЧ (5'-GTGTG-GAAAATCTCTAGCAGT-3'), U5A-ВИЧ (5'-ACTGCTAGAGATTTCASAC-3'), U5B-HFV (5'-ATACAAAATTCCATGACAAT-3'), U5A-HFV (5'-ATGTCATGGAATTTGTAT-3'), синтезировали амидофосфитным методом на автоматическом ДНК-синтезаторе ABI 394 (Applied Biosystems) по стандартному регламенту с использованием коммерческих реагентов (Glen Research) и выделяли электрофоретически в 20 %-ном полиакриламидном геле с 7М мочевиной.

Рекомбинантная интеграза ВИЧ-1 была получена в *Escherichia coli*, выделена и очищена без добавления детергента, как описано в [9]. Интеграза HFV была любезно предоставлена д-ром Мускаде Ж.-Ф. (Высшая школа Кашана, Франция).

3'-концевой процессинг проводили, инкубируя соответствующий 4 нМ ДНК-субстрат, содержащий 5'-[<sup>32</sup>P]-меченную процессируемую цепь U5B, и ИН HFV или ИН ВИЧ в 20 мкл буфера (20 мМ Hepes (рН 7.2), 1 мМ DTT и 7.5 мМ MgCl<sub>2</sub>) при 37 °С. Реакцию останавливали добавлением 80 мкл раствора, содержащего 10 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 0.3 М ацетата натрия, 1 мМ ЭДТА и 0.125 мкг/мкл гликогена, интегразу экстрагировали фенолом, продукты реакции осаждали этанолом и ресуспендировали в 80 %-ном водном растворе формамида. Продукты разделяли электрофоретически в 20 %-ном полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (7М мочевины) с последующим анализом геля на приборе PhosphoImager. О степени протекания 3'-концевого процессинга судили по появлению на радиоавтографе полосы, соответствующей укороченной на два нуклеотида процессируемой цепи дуплекса.

### МЕТОД «ТОРМОЖЕНИЯ» В ГЕЛЕ

[<sup>32</sup>P]-меченный ДНК-субстрат (2 или 10 нМ) инкубировали с различными концентрациями ИН HFV (0–300 нМ) в бу-

фере, содержащем 20 мМ HEPES, pH 7.2, 1 мМ ДТТ, 7.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 %-ный глицерин, при 25 °С в течение 20 мин. Затем смесь анализировали электрофорезом в 8 %-ном ПААГ в буфере, содержащем 20 мМ Tris-CH<sub>3</sub>COOH, pH 7.5, 7.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, при 4–8 °С. Гель анализировали с помощью STORM 840™ Phosphorimager (Molecular Dynamics). Расчет значения эффективной константы диссоциации проводили по уравнению (1).

#### МЕТОД ПОЛЯРИЗАЦИИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

ДНК-субстрат (4 нМ), содержащий остаток флуоресцеина на 5'-конце процессируемой цепи U5В, инкубировали с 100 нМ ИН HFV или ИН ВИЧ в 200 мкл буфера, содержащего 20 мМ HEPES, pH 7.2, 1 мМ дитиотреитол и 7.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, при 37 °С. В процессе инкубации фиксировали изме-

нение значений анизотропии флуоресценции на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian).

Расчет аналогов каталитической константы и константы Михаэлиса в однооборотном режиме проводили по уравнению (2), согласно опубликованным данным [8]:

$$\ln \frac{[DNA]_0}{[DNA]_0 - [DNA_F]} = k_{obs} \times t, \text{ где } k_{obs} = \frac{k_{cat}'}{\frac{K_m'}{[IN]_0} + 1}. \quad (2)$$

*Настоящая работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (гранты 08-04-01252 и 09-04-93107-НЦНИЛ).*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Goulaouic H, Chow S.A. // J. Virol. 1996. V. 70 P. 37–46.
- Katz R.A, Merkel G, Skalka A.M. // Virology. 1996. V. 217 (1) P. 178–190.
- Bushman F.D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 91. (20). P. 9233–9237.
- Bushman F.D, Miller M.D. // J. Virol. V. 71(7). P. 458–464.
- Tan W, Zhu K., Segal D.J., Barbas C.F. 3rd, Chow S.A. // J. Virol. 2004. V. 78(3). P. 1301–1313.
- Tan W, Dong Z., Wilkinson T.A., Barbas C.F. 3rd, Chow S.A. // J. Virol. 2006 V. 80(4). P. 1939–1948.
- Linial M.L. // J. Virol. V. 73. P. 1747–1755.
- Smolov M., Gottikh M., Tashlitskii V., Korolev S., Demidyuk I., Brochon J.C., Mouscadet J.F., Deprez E. // FEBS J. 2006 V. 273 P. 1137–1151.
- Leh H, Brodin P, Bischerour J, Deprez E, Tauc P, Brochon J.C., LeCam E., Coulaud D., Auclair C., Mouscadet J.F. // Biochemistry. 2000. 39. 9285–9294.

УДК 576.316.24

# Биотинилированный компонент входит в состав теломеразного комплекса дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Д.М. ЩербакOVA, М.Э. Зверева\*, О.А. Донцова  
Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова  
\*E-mail: zvereva@genebee.msu.ru

**РЕФЕРАТ** Теломераза достраивает теломерные повторы к одноцепочечной ДНК на концах хромосом. Этот фермент представляет собой сложный рибонуклеопротеидный комплекс. В состав теломеразы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* входят TLC1 РНК, служащая матрицей для синтеза теломерных повторов, теломеразная обратная транскриптаза Est2p, а также ряд вспомогательных белков (Est1p, Est3p, Ku70/Ku80, Sm-комплекс).

Мы обнаружили, что в состав теломеразного комплекса дрожжей входит биотинилированный компонент. Фракция теломеразы, содержащая биотинилированный белок, активна *in vitro* и составляет небольшую долю от общего количества активной теломеразы, выделенной из клеток. У нас имеются предположения о природе биотинилированного компонента.

**Ключевые слова:** теломераза дрожжей, биотин, биотинилирование.

**Список сокращений:** ОТ-ПЦР – обратная транскрипция-полимеразная цепная реакция, ПААГ – полиакриламидный гель, ДЭАЭ-фракция – теломераза, выделенная из дрожжевого экстракта с помощью хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе, п.о. – пар оснований, н.о. – нуклеотидных остатков.

## ВВЕДЕНИЕ

На концах хромосом эукариот находятся теломеры. Эти ДНК-белковые структуры защищают хромосомы от дегенерации и слияния концов [1]. Длину теломер поддерживает фермент теломераза, который присоединяет теломерные повторы ДНК к 3'-концам хромосомной ДНК [2]. Теломераза активна в клетках организма, способных к неограниченному делению, в клетках 85% раковых опухолей [3], а также клетках одноклеточных эукариот (простейшие и дрожжи) [2, 4].

Теломераза – это сложный комплекс, состоящий из РНК и белков [5, 6]. В состав теломеразного комплекса дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* входят обратная теломеразная обратная транскриптаза Est2p [7], теломеразная РНК TLC1 [8], участок которой служит матрицей для синтеза теломерных повторов, вспомогательные белки Est1p [9] и Est3p [10], без которых теломераза не активна *in vivo* [11], а также другие белки (Sm-белки [12], Ku-белки [13] и др.). Помимо белков, являющихся субъединицами активного комплекса, для функционирования теломеразы необхо-

димы другие белки, взаимодействующие с компонентами теломеразы, но не входящие в ее состав. Например, белок Cdc13, привлекающий теломеразу на теломеру и необходимый для функционирования теломеразы *in vivo* [11], не является субъединицей теломеразы [10], хотя и взаимодействует с Est1p [14]. На данный момент детектировано большое количество генов белков, отсутствие которых приводит к укорочению теломер [15]. Известен также ряд белков (шаперон Hsp82p [16] и др.), для которых было показано взаимодействие с отдельными компонентами теломеразного комплекса. Возможно, такие белки необходимы для сборки комплекса или входят в состав теломеразы на определенных этапах регуляции. Такая сложная организация теломеразного комплекса связана со сложной регуляцией его функционирования. Известно, что удлинение теломер происходит в поздней S-фазе клеточного цикла [17, 18] и теломеразы достраивает теломерные повторы преимущественно на самые короткие теломерные концы [19-21]. Регуляция возможна и на стадии сборки теломеразного комплекса и деградации его компонентов. Обнаружение новых взаимодействий белков с компонентами теломеразного комплекса и посттрансляционных модификаций белков, участвующих в работе теломеразы, а также выяснение их роли поможет лучше понять процесс функционирования теломеразы в клетке.

Мы обнаружили, что в состав активного теломеразного комплекса дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* входит биотинилированный компонент. Такие теломеразные комплексы составляют менее половины от общего количества активной теломеразы, выделенной из клетки.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Штаммы.** В работе использован дрожжевой штамм *Saccharomyces cerevisiae* DBY-746  $\alpha$  (*ura3-52, leu2-3,112, trp1-289, his3- $\Delta$ 1*).

**Выделение теломеразы с помощью хроматографии на стрептавидин-сефарозе.** Культуру клеток дрожжей выращивали в объеме 3.2 л среды SC на глюкозе до оптической плотности  $A_{600} = 1.0$ . Клетки осаждали центрифугированием (5 мин, 5000 rpm, ротор JA-10, Beckman, +4 °C), промывали водой 4 раза, затем буфером «str» для выделения (20 mM Трис-НСl (рН 7.5), 100 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ДТТ, 0.1 mM ЭДТА, 10 % (v/v) глицерин, 0.1 % Triton X-100). Полученный осадок клеток механически разрушали перетиранием в жидком азоте и размораживали во льду холодным буфером «str» (10 мл), содержащим ингибиторы протеаз Complete (Roche), PMSF (0.5 mM) и ингибитор РНКаз RNasin (Helicon) (40 ед./мл). Клеточный дебрис осаждали центрифугированием (5 мин, 5000g; 2 раза по 15 мин, 15000 rpm, ротор JA-20, Beckman, +4 °C). В аликвоте полученного экстракта измеряли суммарную концентрацию белка с помощью наборов реактивов «Compat-Able Protein Assay Kit» и «BCA Protein Assay Reagent» (Pierce Biotechnology). В случае эксперимента с предварительной обработкой экстракта авидином его добавляли в экстракт (10 мкг/1 мг суммарного белка) и инкубировали в течение 10 минут при +4 °C. Далее экстракт (10 мг/мл белка) добавляли к предварительно уравновешенной буфером «str»

стрептавидин-сефарозе (200 мкл суспензии (GE Healthcare) на 10 мл экстракта) и инкубировали при перемешивании в течение 1.5 ч при +4 °C. Затем сорбент промывали 6 раз буфером «str». Полученную стрептавидин-сефарозу и все остальные фракции замораживали в жидком азоте и хранили при -80 °C для дальнейшего анализа.

**Выделение теломеразы с помощью анионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе.** Теломеразный комплекс выделяли, как описано в работах [4, 22], с небольшими изменениями: для получения фракций, содержащих теломеразу, элюцию с колонки с ДЭАЭ-целлюлозой проводили линейным градиентом концентрации ацетата натрия (от 100 mM до 1 M). С 10 мл исходного дрожжевого экстракта (10 мг/мл белка) получали 1 мл фракции активной теломеразы, который разделяли на аликвоты, замораживали в жидком азоте и хранили при -80 °C для дальнейшего анализа.

Фракционирование S-100 экстракта и фракций, полученных с помощью хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе, в градиенте плотности глицерина.

Культуру клеток дрожжей выращивали, как описано выше, для выделения теломеразы с помощью хроматографии на стрептавидин-сефарозе, но в среде YPD. Аналогично получали дрожжевой экстракт, вместо буфера «str» использовали буфер для лизиса (25 mM Трис-НСl (рН 7.5), 300 mM NaOAc, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ДТТ, 0.1 mM ЭДТА, 10 % (v/v) глицерин). Далее получали S-100 экстракт ультрацентрифугированием при 100000g и +4 °C в течение 1 ч, затем концентрировали на центриконах Vivaspin 20 (Sartorius, Германия, США). 0.5 мл S-100 экстракта (15 мг/мл суммарного белка) или 0.5 мл ДЭАЭ-фракции наслаивали на заранее приготовленные 15-40 %-ные глицериновые градиенты в буфере для лизиса (объем 10.5 мл). Ультрацентрифугирование проводили при 40 000 rpm при +4 °C в течение 24 ч в SW41 роторе. Собирали 22 фракции по 0.5 мл, замораживали и хранили для дальнейшего анализа.

**Детекция теломеразной активности *in vitro*.** Для анализа активности в реакции использовали 10 мкл полученной суспензии стрептавидин-сефарозы или ДЭАЭ-фракции или фракции, полученной при ультрацентрифугировании. В конечной смеси (20 мкл) содержалось 50 mM Трис-НСl (рН 8.0), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ДТТ, 1 mM спермидина, 0.05 mM ЭДТА (внесено с теломеразной фракцией), 5 % (v/v) (или больше при анализе проб с градиента) глицерина (внесено с теломеразной фракцией), 100 мкМ dTTP, 20 мкКи [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dGTP (3000 Ки/ммоль), 5 мкМ олигодезоксирибонуклеотида TEL11 (5'-TGGTGTGTGGG-3'). Теломеразная фракция в контрольных реакциях была предварительно проинкубирована с РНКазой А (1 мкл раствора (10 мг/мл), 30 мин, 30 °C). Реакцию удлинения TEL11 проводили в течение 1 ч при 30 °C, затем останавливали, добавляя 200 мкл буфера «stop» (20 mM Tris-НСl (рН 8.0), 20 mM ЭДТА, 0.2% Ds-Na) и 3 мкл протеиназы К (20 мг/мл). После инкубации (1 ч, 30 °C) продукты реакции экстрагировали дважды фенолом, один раз смесью хлороформ : изоамиловый спирт (24 : 1), затем осаждали тремя объемами этанола в присутствии 1/10 объема 3M NaOAc и 5 мкг тРНК *E. coli* в качестве соосаждителя. Осадок промывали два раза 80%-ным этанолом, сушили, растворяли в формамидном буфере для нанесения на денатурирующий ПААГ (80%-ный деионизо-

ванный формамид, ТВЕ буфер, 0.1 %-ный ксилен цианола и 0.1 %-ный бромфенолового синего). Продукты реакции, а также 5'-[<sup>32</sup>P]-фосфорилированный TEL11 в качестве маркера длины разделяли электрофорезом в сиквенном 15 %-ном денатурирующем ПААГ в буфере ТВЕ. Гель сушили и анализировали с помощью электронной автордиографии на приборе PhosphorImager (Molecular Dynamics).

**Вестерн-блоттинг для детекции биотинилированных белков.** Белки для анализа проб после ультрацентрифугирования высаживали, постепенно добавляя к пробе пять объемов холодного ацетона, затем выдерживая 24 ч при -20 °С. Осадок промывали холодным ацетоном, сушили и растворяли сначала в буфере, содержащем 8М мочевины и 70 мМ Tris-HCl (рН 7.5), затем добавляли воду и проводили электрофорез белков в 15 %-ном ПААГ в присутствии Ds-Na по Лэммли [23]. Белки из экстракта и ДЭАЭ-фракций предварительно не высаживали, электрофорез проводили в 10-12 %-ном ПААГ. Белки переносили на нитроцеллюлозную (GE Healthcare) или PVDF мембрану (BioRad). Для детекции биотинилированных белков на мембране использовали конъюгат стрептавидин-пероксидаза хрена [24] и набор реактивов ECL (GE Healthcare).

**ОТ-ПЦР анализ.** РНК для ОТ-ПЦР анализа получали фенольной экстракцией анализируемых образцов, далее экстракцией смесью хлороформ : изоамиловый спирт (24 : 1) и высаживанием этанолом в присутствии 1/10 объема 3М NaOAc и тРНК *E. coli* в качестве соосадителя (5 мкг на пробу). Пробы для анализа РНК, связанной на сорбенте, предварительно обрабатывали протеиназой К, как описано выше для детекции теломеразной активности. Все пробы обрабатывали ДНКазой I (1 ед./мкг нуклеиновых кислот или 1 ед. на 100 мкл фракций, полученных при фракционировании в глицериновом градиенте, 1 ч, 37 °С). После этого РНК очищали от белков с помощью экстракции и высаживания, как описано выше. Все пробы растворяли в одинаковом объеме воды (обычно 10 мкл), измеряли концентрацию РНК в образце спектрофотометрически при 260 нм. Для ОТ-ПЦР анализа связывания с сорбентом брали объем, содержащий 0.1 – 0.5 мкг РНК из исходного экстракта, равный объем пробы из несвязавшейся фракции и объем пробы связавшейся фракции с учетом концентрирования TLC1 РНК при связывании ее из экстракта на стрептавидин-сефарозе. При анализе фракций, полученных с градиента, брали на анализ по 1 мкл всех фракций. ОТ-ПЦР анализ проводили с использованием набора реактивов «OneStep RT-PCR Kit» (Qiagen). В качестве ген-специфичных праймеров для анализа TLC1 РНК использовали P2 (5'-GTTTATTCTAGTTTTTCCG-3') и T8 (5'-CGAAGGCATTAGGAGAAG-3'). Продукты ОТ-ПЦР анализировали методом электрофореза в 2%-ном агарозном геле в ТВЕ-буфере (89 мМ Tris, 89 мМ борной кислоты, 2 мМ ЭДТА, рН 8.3)

**РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**В состав активного теломеразного комплекса дрожжей входит биотинилированный белок.**

Известно, что детектировать активную теломеразу непосредственно в дрожжевом экстракте, полученном при разрушении клеток дрожжей, не удается. Это возможно только при обогащении теломеразного комплекса

или с помощью специфичного связывания на аффинном сорбенте компонентов комплекса (Est1p [25], Est2p [26], Est3p [10]), или с помощью обогащения всего комплекса с помощью анионообменной хроматографии [4, 22]. Мы обнаружили, что при связывании дрожжевого экстракта со стрептавидин-сефарозой на аффинном сорбенте детектируется активная теломераза (рис. 1а). Этот факт свидетельствует о том, что на аффинном сорбенте концентрируется теломераза, так как в исходном экстракте активности нет. Характер детектируемой активности такой

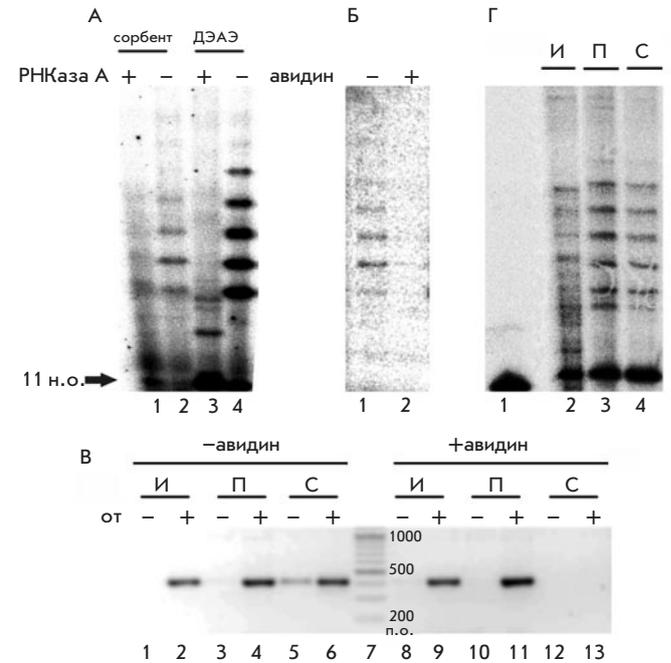


Рис. 1. Выделение теломеразы дрожжей с помощью хроматографии на стрептавидин-сефарозе: а – анализ активности теломеразы, выделенной на стрептавидин-сефарозе из экстракта, в реакции удлинения олигодезоксирибонуклеотида TEL11. РНКаза А(+), РНКаза А(-) – реакция с предварительной обработкой РНКазой А и без нее соответственно; 1, 2 – продукты удлинения TEL11 теломеразой, выделенной с помощью хроматографии на стрептавидин-сефарозе; 3, 4 – то же для теломеразы, выделенной с помощью хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе; б – то же, что и в а с добавлением авидина и без. Авидин(+), Авидин(-) – реакция с предварительной обработкой авидином и без него соответственно; 1, 2 – то же, что в позиции а (1, 2); в – ОТ-ПЦР анализ TLC1 РНК в образцах, полученных при выделении теломеразы на стрептавидин-сефарозе в присутствии авидина и без него. ОТ- и ОТ+ – ОТ-ПЦР анализ без реакции обратной транскрипции и с ней соответственно; 1, 2 – продукты ОТ-ПЦР при анализе исходного дрожжевого экстракта (И); 3, 4 – то же из несвязавшейся фракции (П) при связывании без добавления авидина; 5, 6 – то же из связавшейся фракции (С) при связывании без добавления авидина; 7 – маркер молекулярных масс; 8 – 13 – то же, что и 1 – 6 при связывании с добавлением авидина. г – анализ активности теломеразы, выделенной на стрептавидин-сефарозе из ДЭАЭ-фракции. 1 – 5'-[<sup>32</sup>P]-фосфорилированный олигодезоксирибонуклеотид TEL11; 2 – продукты удлинения TEL11 теломеразой в исходной ДЭАЭ-фракции (И); 3 – то же в несвязавшейся фракции (П); 4 – то же в связавшейся фракции (С), взятой в четырехкратном избытке

же, как и активности теломеразы, выделенной с помощью анионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе, т. е. теломераза добавляет лишь один теломерный повтор в реакции *in vitro* (рис. 1а).

Для проверки того, что наблюдаемое связывание со стрептавидин-сефарозой является результатом взаимодействия «биотин-стрептавидин» (константа диссоциации  $K_d = 10^{-14}$  М [27]) мы провели связывание с предварительной обработкой экстракта авидином. Добавление авидина – стандартный прием для предотвращения связывания со стрептавидин-сефарозой биотинилированных белков из экстракта дрожжей [28], так как взаимодействие «биотин-авидин» (константа диссоциации  $K_d = 10^{-15}$  М [29]) полностью блокирует взаимодействие «биотин-стрептавидин». Действительно, добавление авидина предотвращает связывание теломеразы с аффинным сорбентом (рис. 1б). Этот результат свидетельствует о специфичности взаимодействия. Связывание теломеразы на сорбенте и предотвращение этого связывания добавлением авидина также подтверждено для TLC1 РНК с помощью ОТ-ПЦР анализа (рис. 1в).

На следующем этапе было проведено связывание с аффинным сорбентом теломеразы, уже очищенной с помощью хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе. При этом мы обнаружили, что со стрептавидин-сефарозой действительно связывается активная теломераза, но лишь часть от ее общего количества (рис. 1г) Это может свидетельствовать о том, что биотинилированный белок в своем составе содержит лишь часть комплексов. Также нельзя исключить вероятности того, что при очистке на ДЭАЭ-целлюлозе часть активных теломеразных комплексов «теряет» биотинилированный компонент.

**Биотинилированный белок-компонент теломеразы имеет массу около 50 кДа и входит в состав лишь части от общего количества активной теломеразы.**

Мы провели фракционирование дрожжевого S100 экстракта, а также теломеразы, очищенной на ДЭАЭ-целлюлозе в градиенте масс с помощью ультрацентрифугирования. Центрифугирование обоих типов проб было проведено одновременно и в одинаковых условиях. Известно, что теломеразный комплекс дрожжей при ультрацентрифугировании ведет себя как частица 19S [30]. Мы протестировали полученные фракции на наличие TLC1 РНК, теломеразной активности, а также биотинилированных белков (рис. 2, рис. 3). На рис.2а и рис.2в показано распределение активной теломеразы по фракциям, а на рис. 2б и рис. 2г показано распределение по фракциям TLC1 РНК.

С помощью Вестерн-блоттинга мы детектировали биотинилированные белки в исходном дрожжевом экстракте (рис. 3а) и исходной ДЭАЭ-фракции (рис. 3б), а также распределение биотинилированных белков по фракциям после ультрацентрифугирования (рис. 3в и 3г).

В экстракте и обогащенной на ДЭАЭ-целлюлозе фракции детектируется три наиболее яркие полосы, соответствующие массам 47, 120 и 200 кДа (рис. 3а и 3б). Биотинилированных белков дрожжей известно немного: Asc1 (250 кДа [31]), Hfa1p (242 кДа [32]), Ryc1p (130 кДа [33]), Ryc2p (130 кДа [33]), Dur1,2p (202 кДа [34]) и Arc1p (42 кДа [35]). В целом, детектируемые нами полосы соотносятся с при-

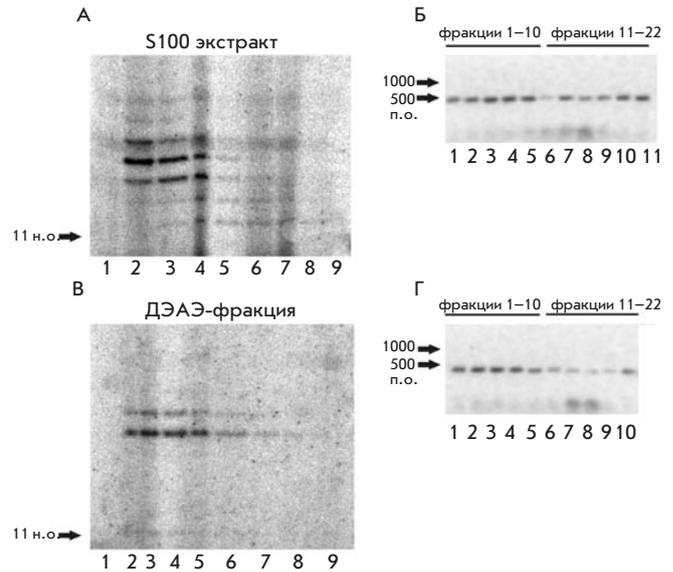


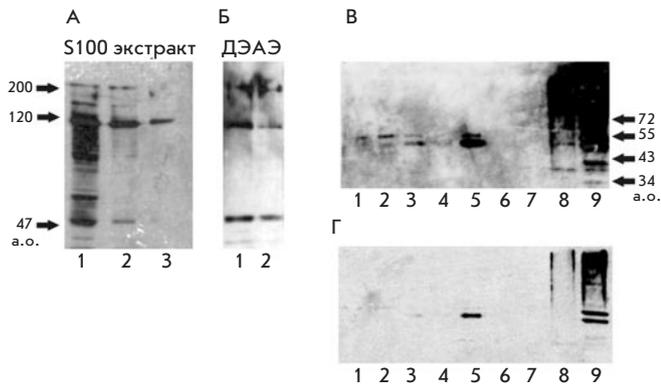
Рис. 2. Анализ фракций, полученных при ультрацентрифугировании в глицириновом градиенте (всего было получено 22 фракции с одного градиента): а – Анализ активности теломеразы во фракциях, полученных при ультрацентрифугировании S100 экстракта, в реакции удлинения олигодезоксирибонуклеотида TEL11; 1 – 9 – продукты удлинения TEL11 теломеразой во фракциях 1 – 9 соответственно; б – ОТ-ПЦР анализ TLC1 РНК во фракциях, полученных при ультрацентрифугировании S100 экстракта; 1 – 9 – продукты ОТ-ПЦР при анализе фракций 1 – 22 соответственно, по две соседние фракции в каждой позиции (1 – 1-я и 2-я фракции, 2 – 3-я и 4-я фракции и т.д.); в – то же, что и в позиции а для фракций, выделенных при ультрацентрифугировании ДЭАЭ-фракции; г – то же, что и в позиции б для фракций, выделенных при ультрацентрифугировании ДЭАЭ-фракции

веденными в литературе [35] и ожидаемыми в соответствии с массами известных белков.

В случае фракционирования обогащенной на ДЭАЭ-целлюлозе теломеразы видно, что вместе с комплексом комигрирует и обогащается биотинилированный белок с массой в районе 50 кДа. Это видно при сопоставлении рис. 2в и 3в. В случае фракционирования экстракта провести сопоставление наличия теломеразной активности в конкретной фракции с наличием биотинилированного белка не представляется возможным из-за того, что во всех фракциях на Вестерн-блоттинге детектируется серия полос, соответствующих всем возможным биотинилированным белкам, аналогичная серии полос в исходном экстракте (данные не показаны).

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ВЫВОДЫ

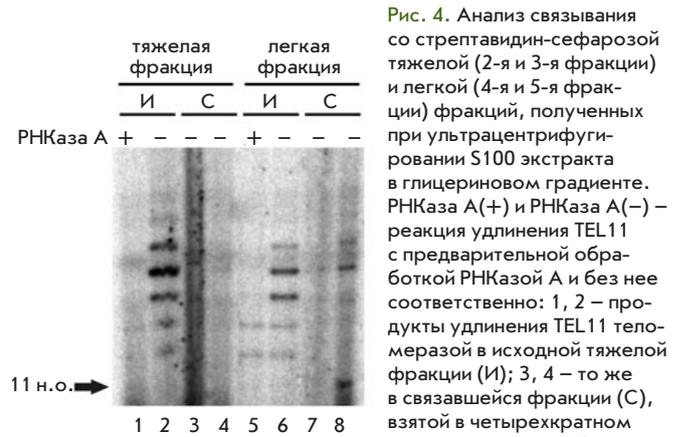
Мы показали, что в состав теломеразного комплекса дрожжей входит биотинилированный белок. Однозначно установить, что это за белок и какова его функция, нам пока не удалось. Из-за малого количества теломеразы в клетке (примерно 29 молекул на клетку гаплоидных дрожжей [36]) и того, что не все теломеразные комплексы содержат



**Рис. 3.** вестерн-блоттинг анализ биотинилированных белков в исходных S100 экстракте, ДЭАЭ-фракции и фракциях, полученных при ультрацентрифугировании в глицириновом градиенте: а – вестерн-блоттинг анализ белков в исходном S100 экстракте; 1 – 3 – биотинилированные белки в раститровке экстракта в уменьшающихся количествах от позиции 1 к позиции 3; б – биотинилированные белки в ДЭАЭ-фракции; 1, 2 – биотинилированные белки в раститровке ДЭАЭ-фракции в уменьшающихся количествах от позиции 1 к позиции 2; в – Вестерн-блоттинг анализ белков во фракциях, полученных при ультрацентрифугировании ДЭАЭ-фракции; 1 – 8 – биотинилированные белки во фракциях 1 – 8 соответственно; 9 – биотинилированные белки в исходной ДЭАЭ-фракции; г – то же, что и в позиции в при короткой экспозиции на пленку

биотинилированный белок, наши попытки идентифицировать искомый белок с помощью MALDI-TOF спектрометрии не увенчались успехом. Также нужно отметить, что элюция белков, связанных на стрептавидин-сефарозе взаимодействием «биотин-стрептавидин», представляет собой отдельную задачу и не проходит количественно из-за прочности взаимодействия [37].

Из рис. 2в и 3в очевидно, что обнаруживаемый биотинилированный белок комигрирует с более легкими теломеразными комплексами. Из этих данных и того факта, что биотинилированный белок содержит менее половины активных теломеразных комплексов, выделенных на ДЭАЭ-целлюлозе (рис. 1г), можно сделать интересное предположение. Возможно, биотинилированный белок входит в состав не всех, а более легких теломеразных комплексов, например, еще находящихся в процессе созревания, но уже включающих в себя Est2p и TLC1 РНК, которые обеспечивают активность *in vitro*. Мы проверили это предположение для фракций, полученных при ультрацентрифугировании S100 экстракта. Две активные тяжелые фракции были объединены, две легкие так же были объединены. Далее было проведено связывание со стрептавидин-сефарозой. Действительно, активная теломераза из более тяжелых фракций не связывается на стрептавидин-сефарозе, тогда как из более легких фракций – связывается (рис. 4). Полученный результат также свидетельствует против гипотезы о том, что биотинилированный компонент «теряется» при очистке на ДЭАЭ-целлюлозе, так как и без очистки с помощью анионообменной хроматографии лишь часть теломеразных комплексов содержит биотинилированный белок.



**Рис. 4.** Анализ связывания со стрептавидин-сефарозой тяжелой (2-я и 3-я фракции) и легкой (4-я и 5-я фракции) фракций, полученных при ультрацентрифугировании S100 экстракта в глицириновом градиенте. РНКазы А (+) и РНКазы А (-) – реакция удлинения РНК TEL11 с предварительной обработкой РНКазой А и без нее соответственно: 1, 2 – продукты удлинения TEL11 теломеразой в исходной тяжелой фракции (И); 3, 4 – то же в связавшейся фракции (С), взятой в четырехкратном и десятикратном избытке, соответственно; 5 – 8 – то же, что и 1 – 4 для легкой фракции

Из полученных нами данных (молекулярная масса белка-кандидата составляет около 50 кДа) и сведений из литературы можно делать предположения о природе биотинилированного белка и его функции. Как было отмечено выше, биотинилированных белков дрожжей известно немного. Это три типа карбоксилаз, содержащих биотин в качестве кофактора: ацетил-КоА-карбоксилазы Acc1p (250 кДа [31]), Hfa1p (242 кДа [32]); пируват-карбоксилазы Puc1p (130 кДа [33]), Puc2p (130 кДа [33]); амидолиаза мочевины Dur1,2p (202 кДа [34]); а также белок Arg1p (42 кДа [35]), который является кофактором аминокил-тРНК-синтетаз [38]. Про белок Arg1p также известно, что он связывает G-квадруплексы ДНК [39]. Среди этих белков по молекулярной массе только Arg1p находится ближе других известных биотинилированных белков к найденному белку. Интересно, что Arg1p не содержит канонической последовательности для биотинилирования биотин-лигазой и биотинилирование не является важным для выполнения белком своих функций [35]. Как РНК-связывающий белок и белок, связывающий квадруплексы ДНК, Arg1p кажется вероятным кандидатом на роль биотинилированного компонента теломеразы. Возможно, что в состав теломеразы входит белок, для которого еще не показано биотинилирование, взаимодействующий, как и Arg1p, с биотин-лигазой Vpl1p и также не имеющий канонической последовательности для биотинилирования.

«Интересен вопрос о возможной функции биотинилированного компонента в теломеразном комплексе. Мы обнаружили, что только более легкая фракция теломеразных комплексов содержит в своем составе биотинилированный белок. Известно, что основными компонентами теломеразы, которые осуществляют реакцию удлинения теломерной ДНК, являются теломеразная обратная транскриптаза Est2p и теломеразная РНК TLC1, а остальные компоненты необходимы для регуляции, сборки, созревания и деградации комплекса [5]. Некоторые из них входят в состав теломеразы лишь временно, на определенной стадии клеточного цикла. Например, белки Est1p и Est3p, необходимые

для функционирования теломеразы *in vivo*, входят в состав комплекса только в поздней S/G2 фазе клеточного цикла [18]. Полученные нами результаты указывают на то, что биотинилированный белок не является постоянным ком-

понентом теломеразного комплекса, а входит в его состав временно, на определенном этапе сборки, регуляции или деградации теломеразы, и, возможно, принимает участие в этих процессах. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. de Lange T. 2002 *Oncogene*, 21, 532-40.
2. Greider C.W., Blackburn E.H. 1987 *Cell*, 51, 887-98.
3. Kim N.W., Piatyszek M.A., Prowse K.R., Harley C.B., West M.D., Ho P.L., Coviello G.M., Wright W.E., Weinrich S.L., Shay J.W. 1994 *Science*, 266, 2011-5.
4. Cohn M., Blackburn E.H. 1995 *Science*, 269, 396-400.
5. Cech T.R. 2004 *Cell*, 116, 273-9.
6. Collins K. 2006 *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 484-94.
7. Counter C.M., Meyerson M., Eaton E.N., Weinberg R.A. 1997 *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 9202-7.
8. Singer M.S., Gottschling D.E. 1994 *Science*, 266, 404-9.
9. Zhou J., Hidaka K., Futcher B. 2000 *Mol Cell Biol*, 20, 1947-55.
10. Hughes T.R., Evans S.K., Weilbaecher R.G., Lundblad V. 2000 *Curr Biol*, 10, 809-12.
11. Lendvay T.S., Morris D.K., Sah J., Balasubramanian B., Lundblad V. 1996 *Genetics*, 144, 1399-412.
12. Seto A.G., Zaug A.J., Sobel S.G., Wolin S.L., Cech T.R. 1999 *Nature*, 401, 177-80.
13. Peterson S.E., Stellwagen A.E., Diede S.J., Singer M.S., Haimberger Z.W., Johnson C.O., Tzoneva M., Gottschling D.E. 2001 *Nat Genet*, 27, 64-7.
14. Evans S.K., Lundblad V. 1999 *Science*, 286, 117-20.
15. Ungar L., Yosef N., Sela Y., Sharan R., Ruppin E., Kupiec M. 2009 *Nucleic Acids Res*, 37, 1198-205.
16. Toogun O.A., Dezwaan D.C., Freeman B.C. 2008 *Mol Cell Biol*, 28, 457-67.
17. Fisher T.S., Taggart A.K., Zakian V.A. 2004 *Nat Struct Mol Biol*, 11, 1198-205.
18. Osterhage J.L., Talley J.M., Friedman K.L. 2006 *Nat Struct Mol Biol*, 13, 720-8.
19. Chang M., Arneric M., Lingner J. 2007 *Genes Dev*, 21, 2485-94.
20. Hector R.E., Shtofman R.L., Ray A., Chen B.R., Nyun T., Berkner K.L., Runge K.W. 2007 *Mol Cell*, 27, 851-8.
21. Sabourin M., Tuzon C.T., Zakian V.A. 2007 *Mol Cell*, 27, 550-61.
22. Lue N.F., Peng Y. 1998 *Nucleic Acids Res*, 26, 1487-94.
23. Laemmli U.K. 1970 *Nature*, 227, 680-5.
24. Hoja U., Wellein C., Greiner E., Schweizer E. 1998 *Eur J Biochem*, 254, 520-6.
25. Steiner B.R., Hidaka K., Futcher B. 1996 *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 2817-21.
26. Friedman K.L., Cech T.R. 1999 *Genes Dev*, 13, 2863-74.
27. Green N.M. 1990 *Methods Enzymol*, 184, 51-67.
28. Srisawat C., Engelke D.R. 2001 *Rna*, 7, 632-41.
29. Green N.M. 1963 *Biochem J*, 89, 585-91.
30. Lingner J., Hughes T.R., Shevchenko A., Mann M., Lundblad V., Cech T.R. 1997 *Science*, 276, 561-7.
31. Hasslacher M., Ivessa A.S., Paltauf F., Kohlwein S.D. 1993 *J Biol Chem*, 268, 10946-52.
32. Hoja U., Marthol S., Hofmann J., Stegner S., Schulz R., Meier S., Greiner E., Schweizer E. 2004 *J Biol Chem*, 279, 21779-86.
33. Brewster N.K., Val D.L., Walker M.E., Wallace J.C. 1994 *Arch Biochem Biophys*, 311, 62-71.
34. Genbauffe F.S., Cooper T.G. 1991 *DNA Seq*, 2, 19-32.
35. Kim H.S., Hoja U., Stolz J., Sauer G., Schweizer E. 2004 *J Biol Chem*, 279, 42445-52.
36. Mozdy A.D., Cech T.R. 2006 *Rna*, 12, 1721-37.
37. Rybak J.N., Scheurer S.B., Neri D., Elia G. 2004 *Proteomics*, 4, 2296-9.
38. Simos G., Segref A., Fasiolo F., Hellmuth K., Shevchenko A., Mann M., Hurt E.C. 1996 *Embo J*, 15, 5437-48.
39. Frantz J.D., Gilbert W. 1995 *J Biol Chem*, 270, 20692-7.

# Сравнение эффективности подавления функциональной активности целевых генов с помощью синтетических модифицированных siРНК и shРНК, экспрессируемых рекомбинантными лентивирусными векторами

П.В. Спири<sup>1</sup>, Д. Баскаран<sup>1</sup>, П.М. Рубцов<sup>1</sup>, М.А. Зенкова<sup>2</sup>, В.В. Власов<sup>2</sup>, Е.Л. Черноловская<sup>2</sup>, В.С. Прасолов<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

<sup>2</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. ак. Лаврентьева, 8

\*E-mail: prasolov@eimb.ru

**РЕФЕРАТ** РНК-интерференция является эффективным природным механизмом модуляции экспрессии генов на посттрансляционном уровне, выявленным как у высших эукариотических организмов животного и растительного происхождения, так и у низших эукариот и вирусов.

В настоящее время РНК-интерференция используется в качестве мощного инструмента исследования функциональной активности генов, с помощью которого получены результаты, представляющие существенный интерес для многих областей фундаментальной биологии. Наряду с этим во многих ведущих лабораториях мира ведутся биомедицинские разработки, нацеленные на создание терапевтических средств нового поколения для лечения наследственных, злокачественных и инфекционных заболеваний различной этиологии, основанных на использовании интерферирующих РНК.

Одной из основных проблем этих работ является поиск эффективных методов доставки интерферирующих РНК в клетки-мишени. В настоящее время для внесения в клетки интерферирующих РНК используют трансфекцию или трансдукцию с помощью вирусных векторов, направляющих в клетках синтез shРНК – предшественников соответствующих siРНК.

В представленной статье приведены результаты сравнения эффективности подавления экспрессии онкогена AML1-ETO с помощью липофекции синтетической siРНК и при использовании лентивирусного вектора, направляющего синтез shРНК – предшественник анти AML1- ETO siРНК.

**Ключевые слова:** ленти- и ретровирусные векторы, РНК интерференция, эмбриональные фибробласты мыши.

**Список сокращений:** AML – Acute Myeloid Leukemia (острый миелоидный лейкоз), CBF – Core Binding Factor (гетеродимерный транскрипционный комплекс), EGFP – Enhanced Green Fluorescent Protein (усиленный зеленый флуоресцирующий белок), GTU – GFP Transducing Units (GFP трансдуцирующие единицы), HDAC – Histone deacetylase (гистоновая деацетилаза), IRES – Internal Ribosome Entry Site (участок внутренней посадки рибосомы), NHR – Nervy Homology Region (область гомологичная белку Nervy), RHD – Runt Homology Domain (домен гомологичный белку Runt), VSV-G – Vesicular stomatitis virus G glycoprotein (белок G вируса везикулярного стоматита).

## ВВЕДЕНИЕ

Контролируемое выключение экспрессии определенных генов представляет значительный интерес для многих направлений фундаментальной молекулярной биологии и прикладных ее областей, в первую очередь для современной биомедицины [1].

Среди разнообразных подходов, применяемых для подавления экспрессии генов (таких как использование антисмысловых нуклеотидов, рибозимов, химических блокаторов, разрушение функциональной активности определенного гена путем внесения соответствующих мутаций в зиготу), наиболее эффективным в настоящее время

является метод, в основе которого лежит механизм РНК-интерференции [2, 3, 4].

Интерференция РНК – это высокоспецифичный механизм подавления экспрессии гена на посттранскрипционном уровне за счет деградации кодируемой этим геном мРНК. Деградация мРНК происходит в результате ее связывания с комплексом, содержащим малую интерферирующую РНК (siРНК), комплементарную нуклеотидным последовательностям этой мРНК, и клеточные белки, в т.ч. эндонуклеазы. [1]

Использование siРНК уже несколько лет с успехом применяется в молекулярной биологии и в биомедицине для изучения функций генов и их взаимодействий, а также с целью создания терапевтических средств нового поколения. Возможно, в будущем siРНК найдут применение в медицине для лечения вирусных и онкологических заболеваний.

Для подавления функциональной активности генов млекопитающих в настоящее время широко используют короткие синтетические двуцепочечные молекулы siРНК длиной 21–22 п.н. [5]. Существует ряд коммерческих фирм, производящих siРНК. На интернет-сайтах этих производителей представлены программы для дизайна siРНК (например, www.qiagen.com). Перенос синтезированных *in vitro* siРНК в клетки обычно осуществляют с помощью трансфекции с использованием искусственных мембран. Эффект интерференции РНК проявляется не сразу после трансфекции клеток, т.к. siРНК индуцирует деградацию мРНК, но не кодируемого ей белка. Обычно эффект развивается в течение 18 ч, однако в случае стабильных белков это время может увеличиваться до 24 ч и даже до 48 ч. Действие siРНК сравнительно непродолжительно и по разным сведениям сохраняется в течение 3–5 клеточных делений [1]. Следует отметить, что продолжительность действия siРНК может зависеть от многих факторов, в частности от природы трансфицируемых клеток. Были разработаны подходы для модификации синтезированных siРНК, что позволяет в некоторых случаях довольно существенно продлить время действия siРНК в клетках и перекрыть время жизни стабильных белков [2].

С целью создания длительного эффекта РНК-интерференции в отношении определенного гена используют ленти- и ретровирусные векторы, в которых стандартными генно-инженерными методами могут быть проклонированы нуклеотидные последовательности, кодирующие смысловую и антисмысловую цепи siРНК, разделенные спейсером, расположенным между ними. Транскрипция такой матрицы приводит к образованию в клетке молекул малых шпилечных РНК, представляющих собой две самокомплементарные цепи, разделенные петлей спейсера. Установлено, что после транскрипции петля, соединяющая две комплементарные последовательности малой шпилечной РНК, отрезается в результате действия внутриклеточного белка Dicer, что, в конечном счете, приводит к образованию специфической siРНК, инициирующей деградацию мРНК гена, подавление активности которого было необходимо осуществить [6].

В рамках данной работы нами с помощью РНК-интерференции было осуществлено подавление экспрессии активированных онкогенов AML1-ETO(t8;21)

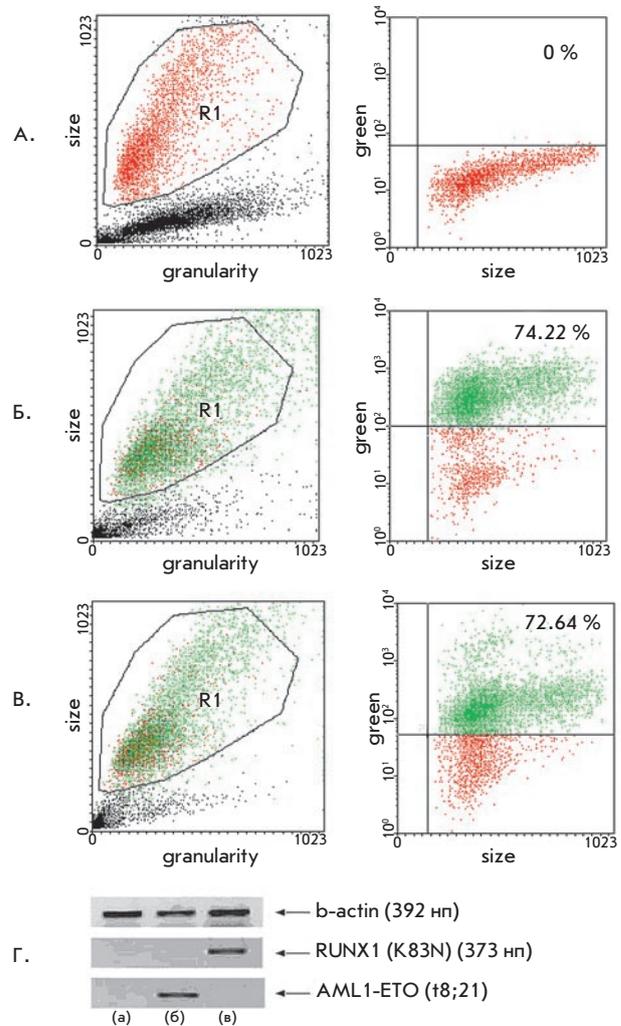


Рис. 1. Эффективность экспрессии трансгенов в клеточных линиях, трансдуцированных рекомбинантными ретровирусными векторами, содержащими гены AML1-ETO и RUNX1-K83N. Гистограммы отображают процент флуоресцирующих клеток в популяциях: а – исходных не трансдуцированных фибробластов линии SC-1; б – фибробластов линии SC-1, трансдуцированных ретровирусными векторами, экспрессирующими онкоген RUNX1-K83N (флуоресценция регистрируется в 74.22 % популяции); в – фибробластов линии SC-1, трансдуцированных ретровирусными векторами, экспрессирующими слитный онкоген AML1-ETO (флуоресценция регистрируется в 72.64 % популяции). Ось X характеризует размер анализируемых частиц (клеток) в абсолютных значениях, ось Y – значение интенсивности флуоресценции частиц (клеток) в абсолютных значениях. Каждая третья гистограмма в ряду разделена на квадранты, правый верхний из которых включает клетки, экспрессирующие EGFP и соответственно AML1-ETO, правый нижний квадрат характеризует клетки, не экспрессирующие EGFP и соответственно онкоген AML1-ETO; г – электрофоретическая продукция ОТ-ПЦР (слева направо): (а) нетрансдуцированные клетки линии SC-1, (б) клетки линии SC-1, трансдуцированные ретровирусными векторами, экспрессирующими RUNX1-K83N, (в) клетки линии SC-1, трансдуцированные ретровирусными векторами, экспрессирующими AML1-ETO

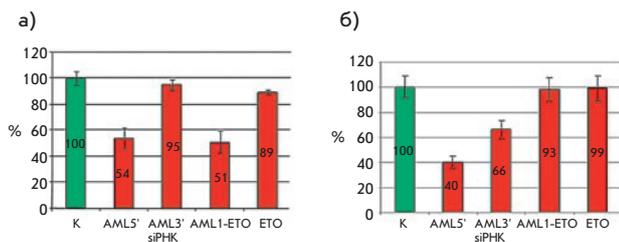


Рис. 2. Результаты измерений, полученных при анализе клеточных суспензий. Представлена зависимость процента флуоресцирующих клеток от трансфицированной в них siРНК: а – процент флуоресцирующих клеток в популяции трансгенных эмбриональных фибробластов мыши, несущих в своем геноме активированный онкоген AML1-ETO через 48 ч после трансфекции их siРНК, комплементарных разным участкам мРНК онкогена; б – процент флуоресцирующих клеток в популяции трансгенных эмбриональных фибробластов мыши, несущих в своем геноме активированный онкоген RUNX1(K83N) через 48 ч после трансфекции их siРНК, комплементарных разным участкам мРНК онкогена

и RUNX1(K83N) – мутантных генов, с высокой частотой выявляемых при острых миелоидных лейкозах [7, 8].

Эта работа позволила провести сравнение эффективности сайленсинга, осуществляемого после введения в модельные клетки, несущие активированный лейкозный онкоген, а) синтетических модифицированных двуцепочечных siРНК методом липофекции и б) после трансдукции модельных клеток рекомбинантными лентивирусными векторами, РНК-геном которых кодирует предшественники шпилечных shРНК.

Для этого использовали модельные клетки, полученные путем трансдукции эмбриональных фибробластов мыши линии SC1 с помощью ретровирусных векторов, несущих в своем составе экспрессирующую кассету: промотор-целевой ген-IRE5 – маркерный ген (EGFP). В качестве целевых генов были использованы слитный онкоген AML1-ETO, возникший в результате хромосомной перестройки t(8:21) или онкоген RUNX1 (K83N), активированный в результате точечной мутации, приводящей к замене в кодируемом онкобелке аминокислоты лизина на аспарагин в 83-м положении. Целевой ген и маркерный ген зеленого белка (EGFP) находятся под общим промотором. Благодаря использованию такой экспрессирующей кассеты по внутриклеточному содержанию маркерного гена EGFP можно судить об экспрессии целевого гена.

Типичные результаты оценки эффективности трансдукции и последующей экспрессии трансгенов приведены на рис. 1.

В работе были использованы исходные фибробласты эмбриона мыши линии SC1, трансгенные клетки линии SC1, несущие в своем геноме трансдуцированные активированные онкогены AML1-ETO или RUNX1(K83N), и клетки почки эмбриона человека линии HEK 293. Клетки всех четырех линий росли на стандартной среде DMEM, содержащей 10 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, 4мМ L-глутамина, 1мМ пирувата натрия, стрептомицин/пенициллин в концентрации 100 мкг/мл

и 100 ед./мл соответственно, при температуре 37 °С в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>.

Дизайн и синтез двуцепочечных siРНК был осуществлен совместно с сотрудниками Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Олигонуклеотиды синтезированы в ИХБФМ СО РАН с помощью фосфитамидного метода с дальнейшей их модификацией метилированием в определенных положениях, с использованием оригинальной методики, которая позволяет существенно увеличивать срок жизни синтетических siРНК в клетке [2]. Последовательности siРНК олигонуклеотидов и схема, показывающая к каким участкам онкогенов они подбирались, приведены в табл.

Перенос siРНК-дуплексов анти-AML1-ETO и анти-RUNX1 в трансгенные клетки линии SC1, несущие соответствующие активированные онкогены, осуществляли методом липофекции с помощью реагента Lipofectamin2000 (Invitrogen) согласно протоколу производителя. Конечная концентрация siРНК дуплексов в культуральной среде составляла 200 нМ.

Через 4 ч в трансфицированных клетках среду меняли на свежую и культивировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °С, в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> в течение 72 ч.

Анализ уровня экспрессии активированных онкогенов осуществляли методом ОТ-ПЦР и методом проточной цитофлуориметрии. Тотальную мРНК из клеточных культур выделяли с помощью тризола (Invitrogen) согласно протоколу производителя. Полученную мРНК использовали для построения первых цепей кДНК с помощью набора ImProm-II™ Reverse Transcriptase (Promega).

Для идентификации в полученной тотальной кДНК нуклеотидных последовательностей исследуемых генов применяли метод ПЦР с праймерами, специфичными к данному гену. Для RUNX1(K83N) использовали праймеры: сенс-AGTCCTACCAATACCTGGGA; антисенс-TCTCAGCTGTGGTGGTGAAG. Для AML1/ETO: сенс-CATTTACCCGAGATAGAG; антисенс-AAGTCCTCGGCGTCACTGAT. Определение уровня экспрессии маркерного гена зеленого флуоресцентного белка EGFP, входящего в состав экспрессирующих кассет, встроенных в геном клеток обеих линий трансгенных клеток, проводили с использованием праймеров: сенс-ACCTACGGCCTGCAGTGCTT; антисенс-TGCCGTTCTTCTGCTTGTCTCG. Продукты ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 1.5 %-ном геле агарозы, обработку результатов проводили с помощью про-



Рис. 3. Электрофореграмма продуктов ОТ-ПЦР после добавления siРНК: 1. siРНК(AML1-5'), 2. siРНК (AML1-3'), 3. siРНК(AML1-ETO), 4. siРНК(ETO), 5. Контроль (без siРНК). Справа указаны размеры продукта ПЦР в парах оснований

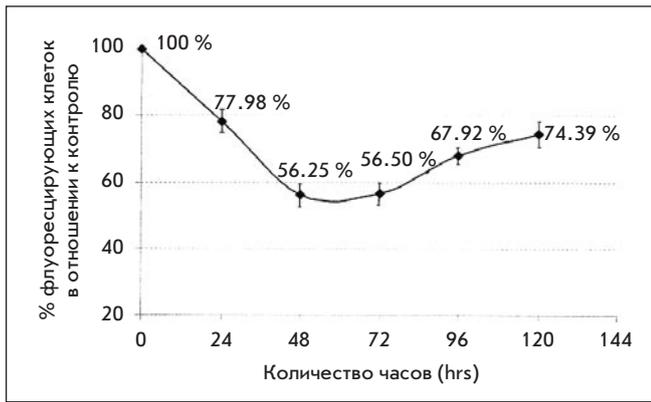


Рис. 4. Кинетика действия siРНК, комплементарной месту слияния генов AML1 и ETO в онкогене AML1-ETO(t8;21)

граммного обеспечения Gel-Pro Analyzer 4.0, в результате для каждой лунки были получены значения максимальной оптической плотности (maxOD). Полученные значения были нормализованы по β-актину.

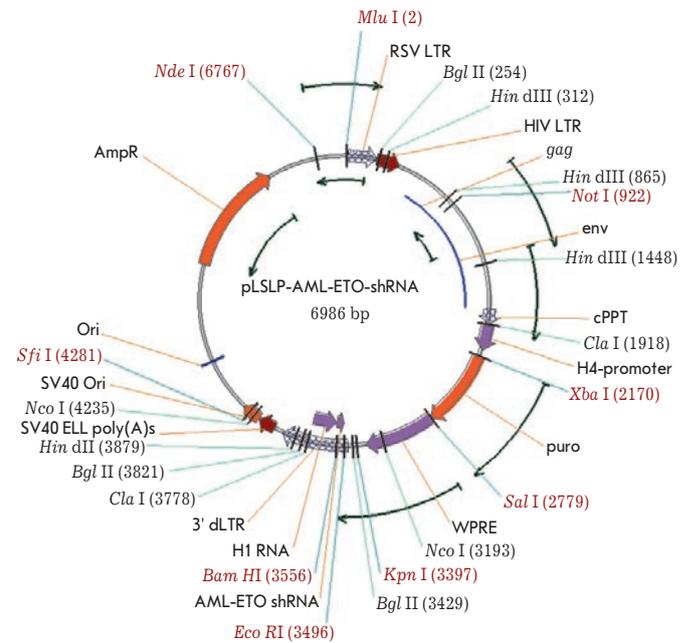
Измерение флуоресценции клеток проводили на проточном цито-флуориметре Epics 4XL Beckman Coulter (США). Сбор и учет данных производили с помощью программного обеспечения WinMDI, версия 2.8.

На рис. 2 представлены диаграммы величины флуоресценции клеток, полученные методом проточной цитофлуориметрии. По оси X – популяции клеток, трансфицированных siРНК, по оси Y – процент флуоресцирующих клеток в популяции.

Результаты, полученные методом проточной цитофлуориметрии, хорошо согласуются с результатами, полученными методом ОТ-ПЦР. На рис. 3 представлены электрофореграммы продуктов ОТ-ПЦР после добавления siРНК. Видно, что в популяции трансгенных клеток, SC-1-AML1/ETO(t8;21) при добавлении siРНК, комплементарной участку онкогена в месте слияния генов AML1 и ETO, AML5'-концевому участку и к участку ETO (табл.), наблюдается снижение уровня содержания соответствующих мРНК. В популяции SC-1-RUNX1(K83N) снижение экспрессии происходит при добавлении siРНК, комплементарной участкам, ближайшим к AML-5'-концу, общему для обоих трансгенов, и участку, близкому к AML-3' концу, который присутствует только в трансгене RUNX1(K83N).

Как видно из рис. 2, в части популяции клеток линий, экспрессирующих онкоген, наблюдается значительное гашение флуоресценции (в 2 и более раз) после добавления синтетической siРНК, в то время как в другой части этой популяции флуоресценция гасится не так значительно. Это совпадает с данными ОТ-ПЦР, представленными на рис. 3. Наиболее вероятной причиной такого явления может быть недостаточно высокая эффективность доставки синтетических siРНК в клетки. В случае трансфекции siРНК, по оценке фирмы-производителя реагента (Invitrogen), используемого для трансфекции в данном эксперименте, эффективность переноса составляет около 50–60 % и зависит от природы используемых клеток. Кроме этого, снижение активности синтетических siРНК может быть связано с их

A.



Б.

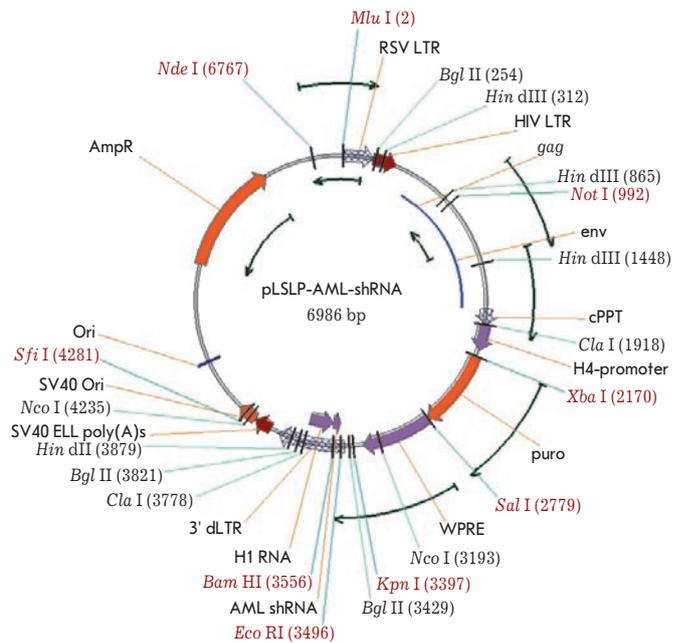


Рис. 5. Lentivirальные векторы, экспрессирующие shRNA: а – pLSLP-AML-ETO-shRNA: lentivirальный вектор, экспрессирующий shРНК – предшественник siРНК, комплементарной мРНК онкогена AML1-ETO в месте слияния генов AML1 и ETO; б – pLSLP-AML-shRNA: lentivirальный вектор, экспрессирующий shRNA – предшественник siРНК, комплементарной 5' концевой области мРНК гена RUNX1

деградацией под действием клеточных эндонуклеаз, несмотря на значительный вклад модификаций, вносимых в последовательности синтетических siРНК, обеспечивающих их относительную стабильность. По нашим данным, наибольшая интерферирующая активность синтетических модифицированных siРНК наблюдается через 48 и 72 ч.

На рис. 4 приведен график, на котором представлена кинетика действия siРНК, комплементарной месту слияния генов AML1 и ETO в онкогене AML1-ETO(t8;21). За начальную точку отсчета приняли момент внесения siРНК.

Показано, что максимальное действие использованной siРНК наблюдается через 48 и 72 ч после трансфекции, когда доля флуоресцирующих клеток в популяции составляет около 56 %. Через 96 и 120 ч процент флуоресцирующих клеток составляет уже 67.92 и 74.39 соответственно. Результаты приведены в отношении к контролю, представлены средние значения из трех параллельных измерений.

Увеличение эффективности РНК-интерференции может быть достигнуто за счет увеличения эффективности внесения интерферирующей РНК в модельные клетки.

Для этого, с учетом структуры эффективно действующей siРНК, нами были сконструированы лентивирусные векторы, геном которых содержал последовательности, направляющие синтез shРНК-шпилек-предшественников siРНК.

Основой для таких генетических конструкций послужил лентивирусный вектор pLSLP, в который вводили последовательность ДНК, кодирующую shРНК шпильку-предшественник siРНК, комплементарную месту слияния генов AML1 и ETO или части гена RUNX1, общей с онкогеном AML1/ETO.

Последовательности ДНК,  
кодирующие анти-AML-ETO shРНК  
AML-ETO-сенс

5'-p-gatccgCCTCGAAATCGTACTGAGGcttcctgtcaTCT-  
CAGTACGATTTTCGAGGtttttg-3'

AML-ETO-антисенс

5'-p-aattcaaaaaCCTCGAAATCGTACTGAGAtgacag-  
gaagCCTCAGTACGATTTTCGAGGcg-3'

Последовательности ДНК,  
кодирующие анти-RUNX1 shРНК  
AML-5-сенс

5'-p-gatccgGAACCAGGTTGCAAGATTTCcttcctgt-  
caAAATCTTGCAACCTGGTTCtttttg-3'

AML-5-антисенс

5'-p-aattcaaaaaGAACCAGGTTGCAAGATTTCgacag-  
gaagGAATCTTGCAACCTGGTTCcg-3'

Дизайн последовательностей осуществлялся с помощью интернет ресурса [http://gesteland.genetics.utah.edu/siRNA\\_scales/index.html](http://gesteland.genetics.utah.edu/siRNA_scales/index.html). Клонирование проводилось с помощью стандартных методов генной инженерии. На рис. 5 представлены карты рестрикции сконструированных лентивирусных векторов, несущих шпилечные структуры.

Для получения лентивирусных вирионов, несущих в своем геноме shРНК шпильку, ДНК рекомбинантных лентивирусных векторов вводили в клетки линии 293Т методом ко-трансфекции с упаковывающими плазмидами, с помо-

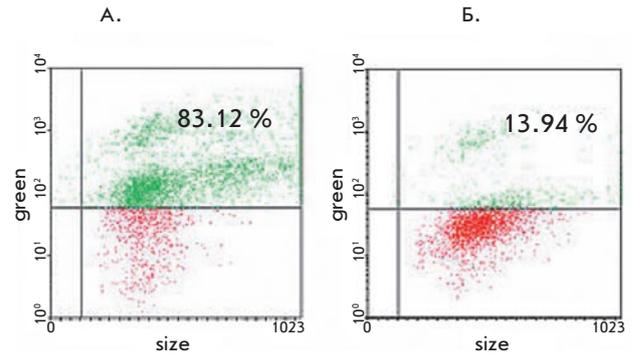


Рис. 6. Диаграмма, показывающая изменение количества флуоресцирующих клеток в популяции линии фибробластов мыши SC-1-AML1/ETO(t8;21), экспрессирующих AML1-ETO: а – до трансдукции лентивирусным вектором и б – после трансдукции лентивирусным вектором, экспрессирующим shРНК шпильку-предшественник siРНК, комплементарную мРНК онкогена AML1-ETO в месте слияния генов AML1 и ETO

щью реагента Lipofectamin 2000 (Invitrogen) согласно протоколу производителя. Вирусные стоки собирали в течение трех дней и использовали для заражения трансгенных клеток, несущих активированные онкогены AML1-ETO и RUNX1(K83N), как описано ранее [9]. Через 48 ч после заражения клетки помещали в селективную среду с антибиотиком пурамицином (5 дней, 10 мкг/мл). Полученную в результате селекции массовую культуру трансгенных

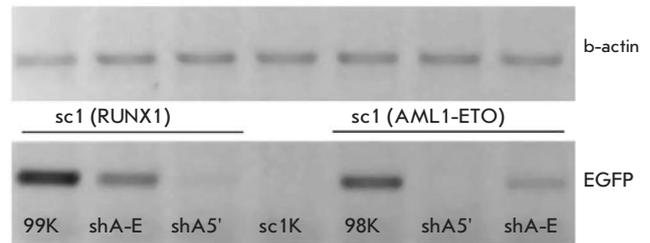


Рис. 7. Электрофореграмма продуктов ОТ-ПЦР, полученная в результате анализа экспрессии активированных онкогенов в линиях трансгенных клеток SC1-AML1/ETO(t8;21) и SC1-RUNX1(K83N), трансдуцированных рекомбинантными лентивирусными векторами, несущими в своем геноме shРНК шпильки-предшественники соответствующих siРНК: 99K – контрольный образец из культуры клеток SC1-RUNX1(K83N), не трансдуцированной лентивирусным вектором; shA-E – продукт анализа образца мРНК из культуры клеток SC1-RUNX1(K83N), трансдуцированной рекомбинантным лентивирусом, несущим шпильку-предшественник siРНК, комплементарной месту слияния AML1 и ETO; shA5' – продукт анализа мРНК из культуры клеток SC1-RUNX1(K83N), трансдуцированной рекомбинантным лентивирусом, несущим шпильку-предшественник siРНК, комплементарной к 5' концевому участку гена AML1; sc1K – контрольный образец из культуры клеток линии SC1, не несущей трансгена и не трансдуцированной рекомбинантным лентивирусным вектором. Последние три образца – результат анализа трансгенных культур клеток SC1-AML1/ETO(t8;21), первый из которых – соответствующий контроль, а каждая из последних двух трансдуцированных соответствующими лентивирусными конструктами

клеток, несущих ген, кодирующий shРНК шпильку, исследовали методом проточной цитофлуориметрии и ОТ-ПЦР.

На рис. 6 представлены гистограммы, из которых следует, что процент флуоресцирующих трансгенных клеток SC1-AML1/ЕТО(t8;21) после трансдукции их ДНК лентивирусного вектора, несущего в своем геноме shРНК шпильку-предшественник siРНК, комплементарной месту слияния генов AML1 и ЕТО, снижается в 6 раз. Соответствующие результаты были получены при анализе трансгенных клеток линии SC1-AML1/ЕТО(t8;21) и SC1-RUNX1(K83N) после трансдукции их лентивирусной конструкцией, несущей в своем геноме shРНК шпильку-предшественник siРНК, комплементарной месту слияния генов AML1 и ЕТО, на изменение процента флуоресцирующих клеток не повлияло (гистограмма не представлена). Результаты, полученные методом проточной цитофлуориметрии, соотносятся с результатами анализа методом ОТ-ПЦР. Электрофореграмма представлена на рис. 7.

### ВЫВОДЫ

Данные, полученные в нашей работе, свидетельствуют о высокой эффективности стабильных синтетических модифицированных siРНК, используемых для подавления экспрессии активированных онкогенов, с высокой частотой выявляемых при острых миелоидных лейкозах.

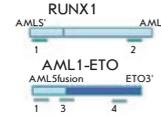
Данные, полученные в опытах с синтетическими siРНК, позволили осуществить дизайн и синтез ДНК-последовательностей, предшественников shРНК, которые были клонированы в лентивирусный рекомбинантный вектор. С помощью лентивирусных векторов ДНК-последовательности, направляющие постоянный внутриклеточный синтез shРНК шпилек-предшественников siРНК, комплементарных к различным участкам активированных онкогенов AML1/ЕТО(t8;21) и RUNX1(K83N), были внесены в трансгенные клетки, несущие в своем геноме эти

Таблица

Мишень	Цепь	Последовательность
AML-ЕТО	sense	5'-CCUCGAAAUCGUmACUmGAGUAG-3'
	antisense	5'-UCUCmAGUmACGAUUUCGAGGUU-3'
ЕТО	sense	5'-GGCCmAGCGGUmACmAGUCmAGAU-3'
	antisense	5'-UUmGGACUmGUmACCGCmGGCCUG-3'
AML (5')	sense	5'-GAACCmAGGUUmGCmAAGAUUGAA-3'
	antisense	5'-AAAUCUUmGCmAACCUmGGUUCUU-3'
AML (3')	sense	5'-AGCCCGGGAGCUUmGUCCUCUU-3'
	antisense	5'-AAGGACmAAGCUCCCGGGCUUmG-3'

### siРНК

1. AML5'
2. AML3'
3. AML1-ЕТО
4. ЕТО



онкогены. Анализ трансдуцированных лентивирусными векторами трансгенных клеток методом проточной цитофлуориметрии и ОТ-ПЦР показал значительное снижение уровня экспрессии активированных онкогенов. Это свидетельствует о значительной эффективности сконструированных нами лентивирусных конструкций, которые можно использовать для подавления экспрессии целевых генов методом РНК-интерференции.

Авторы приносят глубокую благодарность профессору П.М. Чумакову за предоставленный ретровирусный вектор для клонирования последовательностей, направляющих синтез shРНК. ●

*Работа выполнена в рамках проекта по программе фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и проекта по программе фундаментальных исследований Президиума РАН № 27 «Основы фундаментальных исследований нанотехнологий и наноматериалов» и ФЦП "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технического комплекса России на 2007-2012 годы" (ГК 02.512.11.2200 и ГК 02.512.11.2294).*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вильгельм А.Э., Чумаков С.П., Прасолов В.С. // Молекулярная биология. 2006. Т. 40. № 3. С. 1-18.
2. Volkov A.A., Kruglova N.S., Meschaninova M.I., et al. // Oligonucleotides. 2009. Jun;19(2):191-202.
3. Shuey D.J., McCallus D.E., Giordano T. // Drug Discov. Today. 20027. 1040-1046.
4. Stanisławska J., Olszewski W.L. // Arch. Immunol. Ther. Exp. 200553. 39-46.

5. Elbashir S.M., Harborth J., Weber K., Tuschl T. // Methods. 200226. 199-213.
6. Brummelkamp T.R., Bernards R., Agami R. // Science. 2002296. 550-553.
7. Satake N., Maseki N., Kozu T., et al. // British Journ. of Haemat. 199591: 892-898.
8. Peterson L.F., Zhang D.E. // Oncogene. 2004; 23(24):4255-62.
9. Kravchenko J.E., Ilyinskaya G.V., Komarov P.G., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. Apr 29;105(17):6302-7.

УДК 57.085.23

# Получение и характеристика клеток человека с индуцированной плюрипотентностью

М.В. Шутова, А.Н. Богомазова, М.А. Лагарькова, С.Л. Киселев\*

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991, Москва, ул. Губкина, 3

\*E-mail: kiselev@vigg.ru

**РЕФЕРАТ** Клеточная биология – одно из интенсивно развивающихся направлений современной биологии. Особый интерес для клеточной биологии представляют те стадии раннего эмбрионального развития организма, во время которых большинство клеток обладают свойством плюрипотентности. Клетки внутренней клеточной массы бластоцисты могут быть культивированы *in vitro* и получили название эмбриональных стволовых клеток. Эти клетки обладают способностью к дифференцировке в любые типы клеток и тканей. Однако еще больший интерес для практического использования представляет возвращение (репрограммирование) клеток взрослого организма в плюрипотентное состояние. В проведенном нами исследовании из эндотелиальных клеток пупочной вены человека с помощью генетического репрограммирования были впервые получены клетки с индуцированной плюрипотентностью. Мы показали, что морфологически, молекулярно и функционально полученные клетки аналогичны эмбриональным стволовым клеткам человека. Нами было впервые продемонстрировано, что при репрограммировании в клетках человека с индуцированной плюрипотентностью происходит существенное изменение состояния хроматина X хромосомы, инактивированной в женских клетках эндотелия, в сторону ее активации, что свидетельствует о репрограммировании клеток эндотелия и на эпигенетическом уровне.

**Ключевые слова:** плюрипотентность, репрограммирование клеток, реактивация X хромосомы.

**Список сокращений:** эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), клетки с индуцированной плюрипотентностью (иПК).

**В** процессе индивидуального развития многоклеточный организм млекопитающих проходит путь развития от одной единственной клетки, зиготы, до сложного набора взаимообеспечивающих типов тканей. Тотипотентная клетка зиготы и терминально дифференцированная клетка несут один и тот же набор генетической информации, однако эта информация реализуется по разным программам. Клеточные программы дифференцировки реализуются на генетическом и эпигенетическом уровнях. Зигота, реализуя определенную программу, делится, и на определенном этапе клетки начинают специализироваться. На стадии бластоцисты (примерно 3,5-й день у мыши, 5,5-й день у человека) уже есть 2 типа клеток, а сама бластоциста представляет собой будущий эмбрион, но который еще не имел физического контакта с материнским организмом. Из внутренних клеток будет дальше развиваться организм и все его ткани, а внешний слой клеток – трофобластоциста – будет обеспечивать взаи-

модействие с материнским организмом. Клетки внутренней массы бластоцисты, культивируемые в лабораторных условиях, получили название эмбриональных стволовых клеток (ЭСК). Подобраны такие условия культивирования ЭСК, что *in vitro* (вне организма) программа дальнейшего развития ЭСК не реализуется, они сохраняют свойство плюрипотентности неограниченное время [1], но, сменив условия культивирования, можно получить контролируемую дифференцировку ЭСК во все ткани трех зародышевых листков [2]. Однако в плане практического использования этих клеток в терапевтических целях остается нерешенной задача иммунологической совместимости полученных тканей с реципиентом. Идеальным решением представляется репрограммирование индивидуальных соматических клеток до плюрипотентного состояния. Для этого были разработаны технологии переноса ядра соматической клетки в яйцеклетку или слияния соматической клетки с плюрипотентной [3–5]. Однако в 2006 г. С. Яманакой [6] был предло-

жен подход генетического репрограммирования соматической клетки до плюрипотентного состояния. Для индукции плюрипотентности были использованы гены, кодирующие транскрипционные факторы, необходимые для раннего эмбрионального развития и поддержания плюрипотентности *Oct3/4* и *Sox2*, противоапоптозный транскрипционный фактор *Klf4* и транскрипционный фактор, поддерживающий клеточную пролиферацию с-Мус. Эти клетки получили название стволовых клеток с индуцированной плюрипотентностью (иПК). За последние 3 года технология была значительно усовершенствована и уже не требует обязательной генетической модификации [7–9]. Однако спектр типов клеток человека, которые были успешно репрограммированы, остается очень ограниченным [10, 11].

Клетки, которые могут служить источником иПК, должны удовлетворять ряду условий. Во-первых, должны быть «чувствительны» к полному репрограммированию. Во-вторых, должны быть доступны. В-третьих, не должны иметь накопленных повреждений ДНК, как, например, повреждения от УФ или других факторов внешней среды, в клетках кожи. И наконец, чтобы минимизировать возможные повреждения ДНК в процессе манипуляций с клетками *in vitro*, изначальное количество клеток должно быть значительным, а репрограммирование эффективным. Исходя из перечисленных выше критериев, нами была поставлена задача выбора оптимального клеточного типа и генетического репрограммирования выбранных клеток с целью оптимизации их дальнейшего практического применения.

Для репрограммирования нами были выбраны клетки эндотелия пупочной вены человека. Они легко доступны, не накопили повреждений ДНК, могут быть получены в больших количествах без предварительного культивирования, хорошо пролиферируют в культуре только в присутствии факторов, поддерживающих их рост и, в связи с развитием сети банков хранения пуповинной крови, могут храниться длительное время. Данные о репрограммировании клеток эндотелия в литературе отсутствуют. Репрограммирование было проведено с использованием генетических конструкций, ранее опробованных в экспериментах [6]. Эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVES) были трансдуцированы ретровирусными

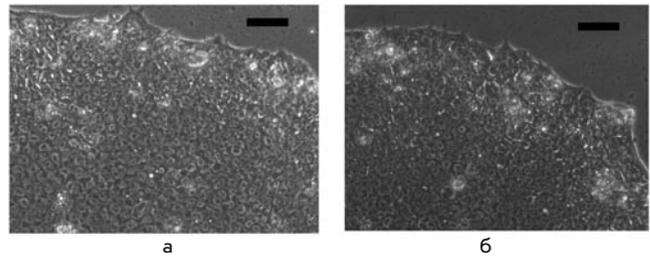


Рис. 1. Морфология полученных из эндотелия иПК человека, растущих в бесфидерных условиях: а – фотография колонии иПК в световом поле; б – фотография колонии ЭСК человека. Масштабная линейка – 100 мкм

векторами, которые содержали кДНК следующих генов: *Oct3/4*, *Sox2*, *KLF4* и *cMyc*. Множественность инфекции составляла 5 вирусных частиц. Через 6 дней после инфекции культуральная среда для эндотелиальных клеток была заменена на среду для ЭСК. Необходимо отметить, что эндотелиальные клетки не пролиферируют в среде для ЭСК, это значительным образом облегчило отбор иПК. Через три недели после вирусной инфекции были отобраны клоны, которые морфологически были идентичны ЭСК человека (рис. 1).

По пролиферативным и молекулярным характеристикам (рис. 2а, б) полученные иПК не отличались от ЭСК человека. С помощью фингерпринтинга мы убедились, что линии иПК произошли именно из клеток эндотелия пупочной вены человека, взятых для репрограммирования, а не являются результатом контаминации линиями ЭСК человека. Копийность интегрированных провирусов, определенная с помощью геномной гибридизации с соответствующими зондами, варьировала в полученных линиях иПК от двух до трех копий каждого вируса на геном. Полученные линии иПК человека обладали свойством плюрипотентности, формировали эмбриоидные тельца (рис. 2в) и дифференцировались в производные трех зародышевых листков. Проведенное кариотипирование показало, что репрограммированные клетки имеют нормальный кариотип и сохраняют его в процессе куль-

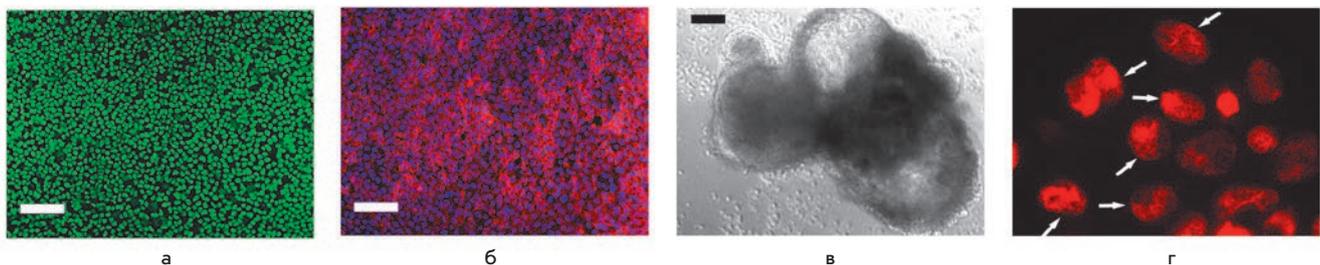


Рис. 2. Анализ свойств иПК человека, полученных из эндотелия пупочной вены: а, б – иммуногистохимический анализ иПК, окраска антителами на специфические маркеры плюрипотентности *Oct-4* (А) и *SSEA-4* (Б). Специфические сигналы окрашены зеленым (а) и красным (б), ядра в (б) окрашены синим (DAPI); в – эмбриоидные тельца, образованные иПК при культивировании в суспензии. Масштабная линейка – 100 мкм; г – интерфазные ядра иПК, окрашенные маркером активного хроматина H3me2K4 (красный). Белые стрелки указывают позицию хромосомной территории, которую занимает частично реактивированная X хромосома

тивирования как минимум на протяжении 22 пассажей. Культивирование линий иПК проводилось в бесфидерных условиях в среде mTeSR1c определенным (defined) составом. Таким образом, нами впервые были получены иПК из клеток эндотелия человека в отсутствие компонентов животного происхождения. Разработанный подход позволяет получать линии иПК, пригодные для клинического использования.

В процессе репрограммирования не только претерпевает изменения генетическая программа клетки, но и должны происходить значительные изменения в эпигенетическом состоянии соматической клетки. В процессе раннего эмбрионального развития в клетках женского организма происходит инактивация одной из X хромосом, при этом на стадии ЭСК обе X хромосомы могут быть активны. Следовательно, можно ожидать, что в процессе репрограммирования произойдут функциональные изменения, приводящие к реактивации неактивной в клетках эндотелия X хромосомы. Нами был проведен иммуноцитохимический анализ X хромосом в полученных иПК с помощью антител к активному (H3me2K4) и неактивному (H3me3K27) хроматину. Полученные результаты показали, что в иПК, на инактивированной X хромосоме, появляется маркер активного хроматина (H3me2K4) (рис. 2г), в то же время

этот маркер отсутствует на инактивированной X хромосоме в клетках эндотелия. Таким образом, нами впервые показано, что в клетках человека при генетическом репрограммировании происходит реактивация неактивной X хромосомы. Из полученных нами результатов следует, что эндотелиальные клетки человека могут быть эффективно и полностью репрограммированы до плюрипотентного состояния, что подтверждается морфологическими, молекулярными и функциональными тестами.

Несомненно, что для практического использования иПК необходимо проведение дальнейших исследований, в частности для подтверждения репрограммирования на уровне всего генома, а также подтверждения безопасности иПК в отношении опухолевой трансформации. Данное направление является одним из самых перспективных в области клеточных технологий, но при этом не следует забывать, что иПК являются лишь искусственным аналогом ЭСК, и для выяснения их прикладной значимости необходимы исследования обеих групп плюрипотентных клеток человека. ●

*Исследование поддержано программой президиума РАН «Биологическое разнообразие», грантом РФФИ 09-04-12199 офн-м и ООО «ЛКТ» (Москва).*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., et al. // Science. 1998. 282(5391): 1145–1147.
2. Lagarkova M.A., Volchkov P.Y., Philonenko E.S., Kiselev S.L. // Cell Cycle. 2008. 7: 2929–2935.
3. Kato Y., Tani T., Sotomaru Y., et al. // Science. 1998. 282: 2095–2098.
4. Tada M., Takahama Y., Abe K., Nakatsuji N., Tada T. // Curr. Biol. 2001. 11: 1553–1558.
5. Matveeva N.M., Shilov A.G., Kaftanovskaya E.M., et al. // Mol. Reprod. Dev. 1998. 50: 128–138.
6. Takahashi K., Yamanaka S. // Cell. 2006. 126: 663–676.
7. Aasen T., Raya A., Barrero M.J., et al. // Nat. Biotechnol. 2008. 26: 1276–1284.
8. Zhou H., Wu S., Joo J., Zhu S., Han D., Lin T., Trauger S., Bien G., Yao S., Zhu Y., et al. // Generation of Induced Pluripotent Stem Cells Using Recombinant Proteins. Cell Stem Cell. doi:10.1016/j.stem.2009.04.005
9. Stadtfeld M., Maherali N., Breault D.T., Hochedlinger K. // Cell Stem Cell. 2008. 2: 230–240.
10. Maherali N., Hochedlinger K. // Cell Stem Cell. 2008. 3: 595–605.
11. Loh Y.H., Agarwal S., Park I.H., et al. // Blood. Prepublished online Mar 18, 2009.

УДК 611-013.3:576.3

# Влияние экспрессии гена *pub* на дифференцировку эмбриональных стволовых клеток мыши в производные экто-, мезо- и энтодермы *in vitro*

Е.В. Новосадова, Е.С. Мануилова, Е.Л. Арсеньева, А.Н. Лебедев, Н.В. Хайдарова, В.З. Тарантул, И.А. Гривенников\*  
Институт молекулярной генетики РАН, Москва, 123182, пл. акад. Курчатова, 2  
\*E-mail: igorag@img.ras.ru

**РЕФЕРАТ** На модели эмбриональных стволовых клеток мыши изучено влияние повышенной и пониженной экспрессии гена *pub* на начальные этапы их дифференцировки в производные экто-, экто- и мезодермы *in vitro*. Методом ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией, было показано, что экспрессия генов *vimentin*, *somatostatin*, *GATA 4*, *GATA 6*, являющихся маркерами энтодермального направления дифференцировки, не изменяется как в клетках с повышенной экспрессией гена *pub*, так и в клетках с его пониженной экспрессией, а также в соответствующих контрольных линиях. В клетках с повышенной экспрессией гена *pub* наблюдалось увеличение экспрессии генов-маркеров мезодермального направления дифференцировки (*trI card*, *trI skel*, *c-kit* и *IL-7*), а в клетках с пониженной экспрессией гена *pub* – снижение их экспрессии. При анализе экспрессии генов-маркеров эктодермальной дифференцировки (*nestin*,  $\beta$ -III *tubulin*, *gfap*, *th*) наблюдалась противоположная картина. В линиях клеток с повышенной экспрессией гена *pub* показано снижение экспрессии этих генов, тогда как при подавлении экспрессии гена *pub* происходило увеличение их экспрессии. Таким образом, предполагается, что изменения в экспрессии гена *pub* в эмбриональных стволовых клетках могут оказывать существенное влияние на дифференцировку этих клеток в мезо- и эктодермальном направлениях.

**Ключевые слова:** эмбриональные стволовые клетки, дифференцировка, полимеразная цепная реакция, ген *pub*, мезодерма, энтодерма, эктодерма.  
**Список сокращений:** Эмбриональные стволовые (ЭС) клетки, фетальная сыворотка коровы (ФСК).

## ВВЕДЕНИЕ

Эмбриональные стволовые (ЭС) клетки представляют собой уникальную модель для изучения процессов, происходящих на ранних этапах эмбриогенеза [1]. Известно, что и в ходе развития зародыша *in vivo* ЭС клетки в культуре способны давать начало всем трем зародышевым слоям: энтодерме, мезодерме и эктодерме и, соответственно, всем развиваю-

щимся из них типам клеток. Анализ экспрессии генов в процессе дифференцировки ЭС клеток в специализированные клеточные типы показал, что последовательность и эффективность экспрессии генов в ходе дифференцировки *in vitro* в целом соответствует последовательности данных процессов *in vivo* [10]. Это указывает на возможность использования ЭС клеток в качестве адекватной экспериментальной

модели для изучения молекулярных механизмов начальных этапов дифференцировки. Кроме того, исследования дифференцировки ЭС клеток в том или ином направлении в ответ на воздействие специфических индукторов (факторов роста, цитокинов) или на непосредственную генетическую модификацию этих клеток позволяют приблизиться к пониманию функции исследуемых соединений и различных генов в данном процессе [1].

Ранее нами с помощью метода вычитающей гибридизации были получены и охарактеризованы клоны кДНК, повышенно транскрибирующиеся в ВИЧ-ассоциированных иммунобластных лимфомах [16, 17]. Анализ этих кДНК позволил выявить среди них, наряду с ранее охарактеризованными генами (*set*, *calpain* и др.), несколько кДНК, кодирующих гены с неизвестными в то время функциями. Один из таких лимфомоспецифичных генов в дальнейшем был назван *pub*. Белковый продукт гена *pub* человека (hPub) имеет высокую степень гомологии (82 %) с мышинным белком Pub (mPub) [5].

Pub относится к семейству TRIM (*tripartite motif*) белков [5], для которых характерно наличие т.н. TRIM (или RBBC) мотива, состоящего из трех цинк-связывающих доменов: RING (R), B-box 1 (B1) и B-box 2 (B2), сопровождаемых coiled-coil (CC) районом [15]. На данный момент известно 37 представителей данного семейства белков. Некоторые из них вовлечены в такие биологические процессы, как регуляция транскрипции, организация цитоскелета, контроль клеточной пролиферации и дифференцировки [18]. Функции гена *hpub* в организме практически не изучены. Для мышинного гомолога *mpub* показано, что он играет важную роль в процессах клеточной дифференцировки и оказывает существенное влияние на транскрипционную активность фактора PU.1 [5]. PU.1 относится к ETS семейству транскрипционных факторов, играет центральную роль в дифференцировке и пролиферации макрофагов и В-клеток в ходе гемопоэза, а также контролирует функциональную активность нейтрофилов [11]. Показано, что продукт гена *mpub* ингибирует транскрипционную активность PU.1 в гемоцитах и вследствие этого играет важную роль в пролиферации и дифференцировке миелоидных и лимфоидных клеток [5].

Для исследования влияния гена *pub* на начальные стадии развития была использована модель ЭС клеток мыши. Ранее нами были получены стабильно трансфицированные клеточные культуры с повышенной экспрессией гена *hpub* (линия ES-hPub), находящегося под контролем промотора цитомегаловируса и с пониженной экспрессией гена *mpub* (линия ES-RNAi) в результате действия интерферирующей РНК, а также соответствующие им контрольные линии (ES-DNA3 и ES-pJneo) [2]. Было показано, что повышенная экспрессия *hpub* приводила к увеличению, а пониженная экспрессия эндогенного *mpub* – к уменьшению образования ЭС клетками эмбрионидных тел, однако не оказывала влияния на пролиферативную активность этих клеток [2, 3].

В данной работе методом полимеразной цепной реакции, сопряженной с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), проведена оценка влияния повышенной и пониженной экспрессии генов *mpub* и *hpub* на экспрессию генов-маркеров энто-, мезо- и эктодермальной дифференцировки в культурах трансфицированных ЭС клеток мыши.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ЭС КЛЕТОК

В работе использовали ЭС клетки мыши линии R1, любезно предоставленные А. Nagy (Mount Sinai Hospital, Toronto, Canada). Культивирование ЭС клеток проводили при 37 °C и 5 % CO<sub>2</sub> в среде альфа-МЕМ (Sigma, США), содержащей 15 % фетальной сыворотки коровы (ФСР) (Gibco, США), 0.1 мМ 2-меркаптоэтанол, 2 мМ L-глутамин, заменимые аминокислоты (Gibco, США), нуклеозиды, витамины и антибиотик гентамицин (20 мкг/мл). В качестве питающего (фидерного) слоя для ЭС клеток использовали первичные фибробласты, полученные от мышей 11–12-го дней эмбрионального развития, пролиферация которых была блокирована митомицином С (5 мкг/мл). Ростовой средой для первичной культуры фибробластов служила среда ДМЕМ (Sigma, США), содержащая 10 % ФСР, 2 мМ L-глутамин и антибиотик гентамицин (20 мкг/мл). При культивировании ЭС клеток без фидерного слоя в среду добавляли LIF (фактор, ингибирующий лейкемию) (Sigma, США) в конечной концентрации 10 нг/мл, который блокировал спонтанную дифференцировку этих клеток. Пересев клеток со сменой среды осуществляли каждые 3 дня.

### ИНДУКЦИЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ЭС КЛЕТОК С ОБРАЗОВАНИЕМ ЭМБРИОИДНЫХ ТЕЛ

Для индукции дифференцировки с образованием эмбрионидных тел ЭС клетки изолировали от фибробластов фидерного слоя. Клетки обрабатывали трипсином, центрифугировали, а затем полученную суспензию инкубировали в чашке Петри (d = 60 мм) (Nunc, Дания) в течение 10–20 мин в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. В течение этого времени основная масса фибробластов прикрепляется ко дну чашки, в то время как ЭС клетки остаются в суспензии. Для формирования эмбрионидных тел суспензию ЭС клеток переносили на чашку Петри (d = 35 мм) (Nunc, Дания) в количестве 200 000 клеток в 2 мл среды, либо на 96-луночную иммунологическую планшетку (по 1000 клеток на лунку, в 100 мкл среды), затем помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор. На третьи сутки культивирования образовавшиеся эмбрионидные тела переносили на чашки, покрытые желатиной, для дальнейшей дифференцировки.

### ВЫДЕЛЕНИЕ ТОТАЛЬНОЙ РНК И ПРОВЕДЕНИЕ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ

Тотальную РНК из дифференцированных ЭС клеток, а также из других клеточных линий и тканей выделяли методом фенол-хлороформной экстракции с использованием набора YellowSolve (Clonogen, Россия), следуя рекомендациям производителя. Процедуру обратной транскрипции проводили с использованием набора фирмы «Силекс» (Россия), согласно протоколу и рекомендациям производителя. Синтез кДНК проводили на 0.5 мкг тотальной РНК в течение 1 ч при 37 °C в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 0.05 мкг случайных гексапраймеров и 100 ед. обратной транскриптазы MMLV (moloney murine leukemia virus). После остановки реакции (инкубация 10 мин при 70 °C) образцы кДНК хранили при – 20 °C.

### ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в 25 мкл реакционной смеси, состоящей из Taq-буфера, 1.5 мМ смеси

dNTP, 1,25 ед. «colored» Taq полимеразы («Синтол», Россия), 0,5 мкл образца кДНК и 10 пмоль каждого праймера. Праймеры, подобранные для соответствующих генов, а также условия ПЦР и длины продуктов, представлены в табл. Продукты ПЦР разделяли в 1,5-ном % агарозном геле с визуализацией с помощью бромистого этидия и далее анализировали с помощью системы BioDocAnalyze (Biometra, ФРГ).

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Известно, что дифференцировка в эктодермальном направлении дает начало нервной системе и эпителию, энтодермальном – печени, поджелудочной железе, щитовидной железе и легким, и мезодермальном – крови, скелетной и сердечной мускулатуре (<http://stem-cells.ru>).

На модели ЭС клеток мыши мы исследовали влияние изменений в экспрессии генов *trub* и *hpub* на дифференцировку этих клеток в эктодермальном, энтодермальном и мезодермальном направлениях.

Для этой цели были выбраны специфические гены-маркеры, характеризующие разные типы клеток, происходящих из того или иного зародышевого листка, которые представлены на рис. 1.

Трансфицированные ЭС клетки четырех линий (ES-hPub, ES-DNA3, ES-Ineo, ES-RNAi) подвергались «спонтанной» дифференцировке, т.е. без добавления специфических индукторов определенных типов клеточной дифференцировки. Наличие экспрессии и изменения в ее уровне определяли с помощью метода ОТ-ПЦР. В случае

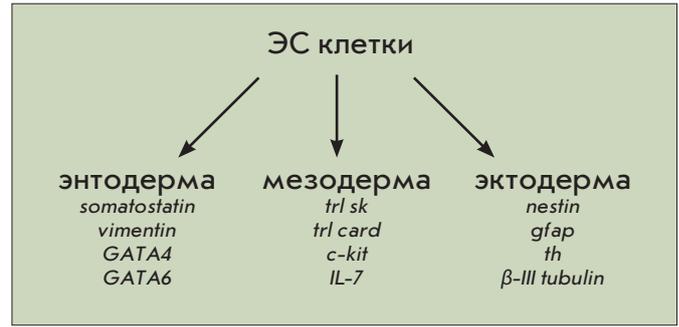


Рис. 1. Гены-маркеры определенных направлений дифференцировки ЭС клеток, использованные в экспериментах

энтодермальной и мезодермальной дифференцировки клетки анализировали на 10-й день, а в случае эктодермальной – на 21-й день культивирования [6].

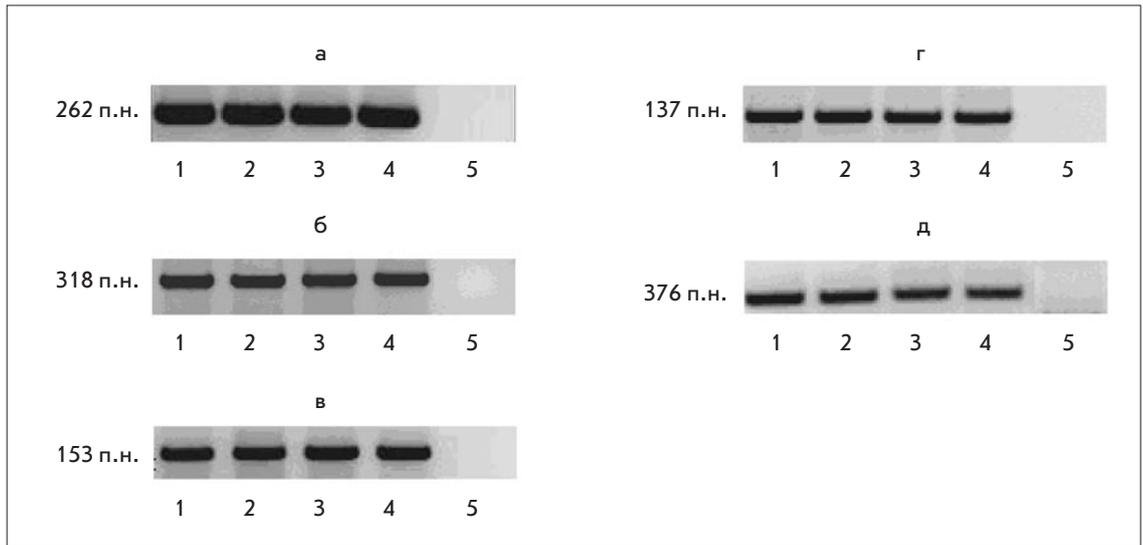
**ВЛИЯНИЕ ПОВЫШЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА H PUB И ПОНИЖЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА M PUB НА ЭНТОДЕРМАЛЬНУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ТРАНСФИЦИРОВАННЫХ ЭС КЛЕТОК**

GATA 4, GATA 6 относятся к семейству транскрипционных факторов. Они играют определенную роль в регуляции генов, вовлеченных в эмбриогенез, а также в развитие кардиоваскулярной системы и висцеральной энтодермы. На примере таких организмов, как zebrafish и Xenopus

Таблица Праймеры, использованные в полимеразной цепной реакции

№	Название гена	Структура праймеров	Т отжига (°C)	Кол-во циклов	Размер продукта (п.н.)
1	GAPDH	5'-TCCATGACAACCTTTGGCATTGTGG-3'-s 5'-GTTGCTGTTGAAGTCGCAGGAGAC-3'-as	66	27	376
2	pub	5'-CCCATTTGGAAGACGCCG-3'-s 5'-AGGGTGGCTCAGCTCCG-3'-as	70	43	328
3	hpub	5'-GCAGCAGCACATTGACAACA-3'-s 5'-TCCACGAGGCCCTTAAAGAA-3'-as	60	30	382
7	GATA 4	5'-GGTTCCCAGGCCTCTTGCAATGCGG-3'-s 5'-AGTGGCATTGCTGGAGTTACCGCTG-3'-as	65	40	153
8	GATA 6	5'-CCGCGAGTGCCTGAACT-3'-s 5'-CGCTTCTGTGGCTTGATGAG-3'-as	65	40	137
9	trI card	5'-CCACACGCCAAGAAAAAGTC-3'-s 5'-AAGCTGTTCGGCATAAAGTCCT-3'-as	62	32	204
10	trI skel	5'-CACACTCTGCAGTCTGTGGTGAG-3'-s 5'-CTGAAGGGCACTGAGAGACAGAC-3'-as	64	35	314
12	nestin	5'-CGCTGGAACAGAGATTGGAAGG-3'-s 5'-GTCTCAAGGGTATTAGCAAG-3'-as	58	30	375
13	gfap	5'-TCCTGGAACAGCAAACAAG-3'-s 5'-CAGCCTCAGGTTGGTTTCAT-3'-as	61	42	224
14	β-III tubulin	5'-GAGGAGGAGGGGAGATGTA-3'-s 5'-CCCCGAATATAAACACAACC-3'-as	65	35	348
15	th	5'-TGCACACAGTACATCCGTCA-3'-s 5'-TCTGACACGAAGTACACCGG-3'-as	60	35	376
16	vimentin	5'-ACCTGTGAAGTGGATGCCCT-3'-s 5'-AAATCCTGCTCTCCTCGCCTT-3'-as	55	30	318
17	somatostatin	5'-CAGACTCCGTCAGTTCTGC-3'-s 5'-ACAGGATGTGAAAGTCTTCCA-3'-as	56	30	262
18	c-kit	5'-TGTCTCTCCAGTTCCCTGC-3'-s 5'-TTCAGGGACTCATGGGCTCA-3'-as	58	45	765
19	IL-7	5'-ACATCATCTGAGTGCCACA-3'-s 5'-CTCTCAGTAGTCTCTTTAG-3'-as	57	45	355

**Рис. 2.** Экспрессия генов, вовлеченных в энтодермальную дифференцировку стабильно трансфицированных ЭС клеток (10 дней дифференцировки *in vitro*). Данные ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. Гены: а) *somatostatin*, б) *vimentin*, в) *GATA 4*, г) *GATA 6*, д) ген сравнения – *GAPDH*. Линии клеток: 1. ES-hPub, 2. ES-DNA3, 3. ES-RNAi, 4. ES-rpneo. 5. отрицательный контроль (вода)



было показано, что гены *GATA 4, 6* играют важную роль на ранних стадиях развития сердца [7, 8, 12–14]. Более того, нокаут генов *GATA 4, 6* у мышей приводил к эмбриональной гибели на стадии гаструляции, обусловленной нарушением формирования дефинитивной энтодермы [19].

В результате проведенных экспериментов не было отмечено различий в экспрессии генов *vimentin, somatostatin, GATA 4, GATA 6* как в дифференцированных клетках с повышенной экспрессией гена *hpub*, так и в клетках с пониженной экспрессией гена *trub*, а также в соответствующих контрольных линиях (рис. 2). Таким образом, можно предположить, что изменения в экспрессии гена *pub* не влияют на дифференцировку ЭС клеток в энтодермальном направлении.

### ВЛИЯНИЕ ПОВЫШЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *HPUB* И Пониженной экспрессии гена *MRUB* НА мезодермальную дифференцировку трансфицированных ЭС клеток

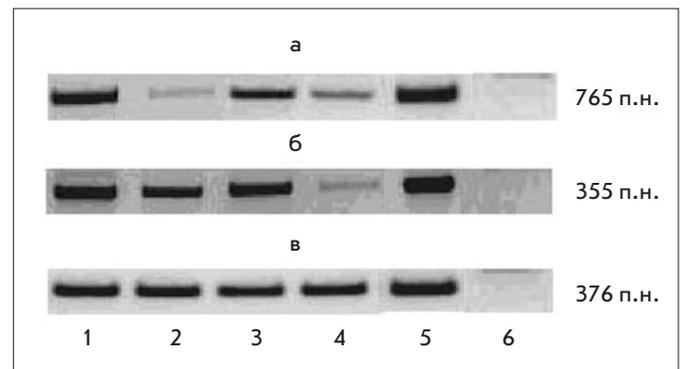
На следующем этапе мы проверили влияние экспрессии генов *hpub* и *trub* на дифференцировку клеток в мезодермальном направлении. Учитывая гомологию мышечного гена *trub* и человеческого гена *hpub*, можно предположить, что продукт гена *hpub* также будет ингибировать транскрипционную активность PU.1 и тем самым влиять на дифференцировку клеток гемопоэтического ряда. Чтобы проверить эту гипотезу, мы исследовали влияние повышенной экспрессии гена *hpub* и пониженной экспрессии гена *trub* на дифференцировку ЭС клеток по лимфоидному пути. Для этого нами были выбраны специфические гены-маркеры для лимфоидных клеток, такие как *c-kit* и *IL-7* [7]. ПЦР анализ трансгенных клеточных линий на 10-день культивирования показал, что повышенная экспрессия гена *hpub* приводит к увеличению экспрессии обоих генов-маркеров, а ингибирование эндогенного гена *trub*, напротив, к снижению их экспрессии по сравнению с соответствующими контролями (рис. 3).

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что повышенная экспрессия гена *hpub* может способствовать дифференцировке ЭС клеток по лимфоидному пути.

Для определения влияния разнонаправленной экспрессии гена *pub* на дифференцировку ЭС клеток в другие производные мезодермы были выбраны два гена *trI sk* (скелетный тропонин I), *trI card* (сердечный тропонин I). В сердце зародыша человека экспрессируются как сердечная изоформа белка, так и изоформа из медленных скелетных волокон. После рождения экспрессия скелетно-мышечной изоформы тропонина I блокируется, а синтез сердечной изоформы, наоборот, стимулируется [5].

Как видно из рис. 4, действительно, экспрессия генов *trI card* и *trI sk* осуществляется на разном уровне. В трансфицированных клетках с суперэкспрессией гена *hpub* экспрессия этих генов также повышена, по сравнению с контрольной линией, а клетки с подавлением экспрессии гена *trub*, наоборот, демонстрируют более низкий уровень экспрессии генов тропонина I по сравнению с контрольной линией.

Полученные результаты свидетельствуют о возможном влиянии генов *trub* и *hpub* на дифференцировку ЭС клеток в различные производные мезодермы, причем суперэк-



**Рис. 3.** Экспрессия генов *c-kit* и *IL-7* в стабильно трансфицированных ЭС клетках (10 дней дифференцировки *in vitro*). Данные ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. Гены: а) *c-kit*, б) *IL-7*, в) ген сравнения – *GAPDH*. Линии клеток: 1. ES-hPub, 2. ES-DNA3, 3. ES-RNAi, 4. ES-rpneo, 5. тимус мыши (положительный контроль). 6. отрицательный контроль (вода)

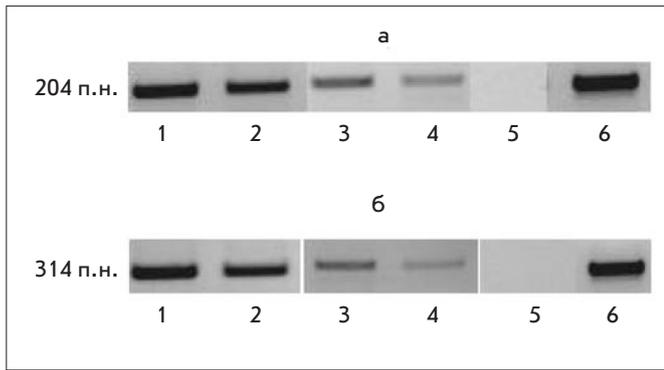


Рис. 4. Экспрессия генов тропонина I сердечной (*trl card*) и скелетной (*trl sk*) форм соответственно в стабильно трансфицированных ЭС клетках (10 дней дифференцировки *in vitro*). Данные ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. а) ген *trl card*. Линии клеток: 1. ES-hPub, 2. ES-DNA3, 3. ES-plneo, 4. ES-RNAi, 5. отрицательный контроль (вода), 6. положительный контроль (сердце взрослой мыши) б) ген *trl sk*. Линии клеток: 1. ES-hPub, 2. ES-DNA3, 3. ES-plneo, 4. ES-RNAi, 5. отрицательный контроль (вода), 6. положительный контроль (сердце эмбрионов мыши)

спрессия гена *hpub* приводит к повышению уровня мРНК для ряда генов-маркеров этого типа дифференцировки.

#### ВЛИЯНИЕ ПОВЫШЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА HPUB И ПОНИЖЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА MPUB НА ЭКТОДЕРМАЛЬНУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ТРАНСФИЦИРОВАННЫХ ЭС КЛЕТОК

Для изучения влияния генов *hpub* и *mpub* на дифференцировку ЭС клеток в эктодермальном направлении были использованы следующие гены-маркеры: *nestin*,  $\beta$ -III *tubulin*, *gfap* и *th*. Ген *nestin* экспрессируется в нейральных стволовых клетках, молодых нейронах, некоторых глиальных клетках и эпендимальных клетках. Его экспрессия наблюдается на ранних стадиях формирования центральной и периферической нервной системы. Гены  $\beta$ -III *tubulin* и *gfap* кодируют белки цитоскелета нейронов и глиальных клеток соответственно. Ген тирозингидроксилазы *th* экспрессируется в дофаминергических нейронах [19]. Данные относительно экспрессии этих генов в опытных и контрольных линиях ЭС клеток представлены на рис. 5.

#### ВЫВОДЫ

Как видно из результатов ПЦР анализа, в клетках с повышенной экспрессией гена *hpub* наблюдается снижение экспрессии генов, вовлеченных в нейральную дифференцировку, а в клетках с пониженной экспрессией *mpub*, на

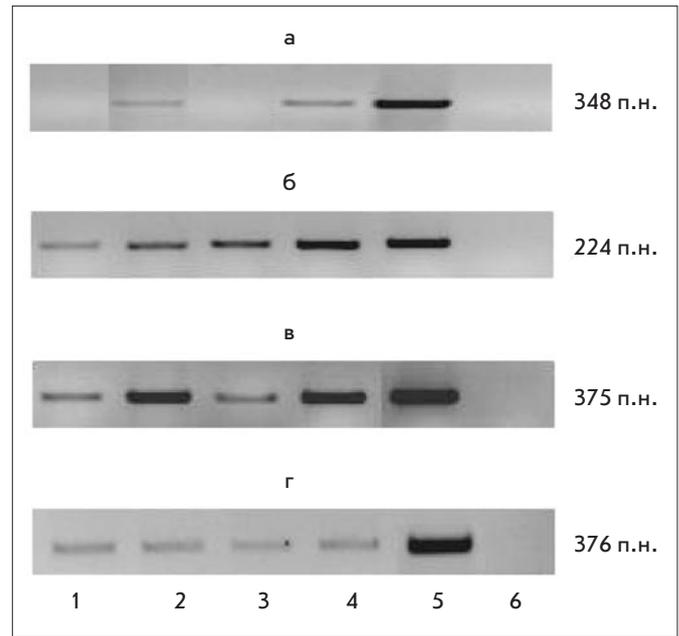


Рис. 5. Экспрессия генов, вовлеченных в эктодермальную дифференцировку стабильно трансфицированных ЭС клеток (21-й день дифференцировки *in vitro*). Гены: а)  $\beta$ -III *tubulin*, б) *gfap*, в) *nestin*, г) *th*. Линии клеток: 1. ES-hPub, 2. ES-DNA3, 3. ES-plneo, 4. ES-RNAi, 5. положительный контроль (гипокамп мыши), 6. отрицательный контроль (вода)

против, увеличение экспрессии этих генов по сравнению с контролями. Такая картина характерна для трех (*nestin*,  $\beta$ -III *tubulin*, *gfap*) из четырех проанализированных генов. Экспрессия гена *th* остается на одинаковом уровне для всех четырех линий клеток. Данный результат можно объяснить тем, что изменения в экспрессии гена *pub* не оказывают влияние на образование дофаминергических нейронов, для которых характерно наличие экспрессии гена *th*. Таким образом, в результате проведенных экспериментов показано, что суперэкспрессия гена *hpub* или подавление экспрессии гена *mpub* в ЭС клетках мыши приводит к существенному изменению в экспрессии ряда генов-маркеров производных отдельных зародышевых листков и, следовательно, может оказывать определенное, причем разнонаправленное, влияние на дифференцировку клеток в мезо- и эктодермальном направлениях. ●

Настоящая работа частично поддержана грантом Министерства образования и науки РФ (ГК № 02.512.12.2013) и грантом РФФИ (09-04-01117).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гривенников И.А. // Успехи биол. химии. 2008. Т. 48. С. 181–220.
- Новосадова Е.В., Мануилова Е.С., Арсеньева Е.Л., и др. // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2005. № 3. С. 174–179.
- Новосадова Е.В., Мануилова Е.С., Арсеньева Е.Л., и др. // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. 2005. Т. 1. № 2. С. 14–21.
- Новосадова Е.В., Мануилова Е.С., Арсеньева Е.Л., и др. // Медицинская генетика. 2008. № 8. С. 43–46.
- Dhoot G., Perry S. // Exp. Cell. Res. 1978. V. 117. P. 357–370.
- Fraichard A., Chassande O., Bilbaut G., et al. // J. Cell Sci. 1995. V. 108. P. 3181–3188.
- Holtzinger A., Evans T. // Development. 2005. V. 132. P. 4005–4014.
- Holtzinger A., Evans T. // Dev. Biol. 2007. V. 312. P. 613–622.
- Jiang Y., Henderson D., Blackstad M., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2003. V. 18. P. 11854–11860.

- Keller G. // Genes & Dev. 2005. V. 19. P. 1129–1155.
- Lloberas J., Solier C., Celada A. // Immunol. Today. 1999. V. 20. P. 184–189.
- Peterkin T., Gibson A., Patient R. // EMBO J. 2003. V. 22. P. 4260–4273.
- Peterkin T., Gibson A., Patient R. // Dev. Biol. 2007. V. 311. P. 623–635.
- Reiter J., Alexander J., Rodaway A., et al. // Genes Dev. 1999. V. 3. P. 2983–2995.
- Reymond A., Meroni G., Fantozzi A., et al. // EMBO J. 2001. V. 20. P. 2140–2151.
- Tarantul V.Z., Nikolaev A.I., Martynenko A., et al. // AIDS Res. Hum. Retroviruses. 2000. V. 16. P. 173–179.
- Tarantul V., Nikolaev A., Hannig H., et al. // Neoplasia. 2001. V. 3. P. 132–142.
- Torok M., Etkin L. // Differentiation. 2000. V. 67. P. 63–71.
- Zhao R., Watt A.J., Battle M.A., Li J., Bondow B.J., Duncan S.A. // Dev. Biology. 2008. V. 317. P. 614–619.

УДК 576.5

# Характеристика фенотипа клеток из амниотической жидкости человека

Д.А. Давыдова<sup>1,\*</sup>, Е.А. Воротеляк<sup>1</sup>, Ю.А. Смирнова<sup>1</sup>, Р.Д. Зиновьева<sup>1</sup>, Ю.А. Романов<sup>2</sup>, Н.В. Кабаева<sup>2</sup>, В.В. Терских<sup>1</sup>, А.В. Васильев<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 26

<sup>2</sup> ФГУ Российский Кардиологический Научно-производственный комплекс, 121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, 15а

\*E-mail: davydovad@gmail.com

**РЕФЕРАТ** Стволовые клетки, обладающие высоким пролиферативным потенциалом и способные к дифференцировке в различных направлениях, являются важным источником клеток для регенеративной медицины. В последнее время большое внимание уделяется фетальным стволовым клеткам, к которым относятся и клетки из амниотической жидкости (АЖ). Мы получили культуры амниотических стволовых клеток от трех доноров. По результатам проточной цитофлуориметрии, иммуногистохимии и ОТ-ПЦР эти клетки экспрессируют маркеры мезенхимного (CD90, CD73, CD105, CD13, CD29, CD44, CD146), нейтрального ( $\beta_3$ -tubulin, Nestin, Pax6), а также эпителиального (кератин 19, p63) типов дифференцировки. Кроме того, показана экспрессия в этих клетках маркеров плюрипотентности – Oct4, Nanog, Rex-1. Трансплантация клеток иммунодефицитным животным не приводит к образованию тератом. Таким образом, стволовые/прогениторные клетки, выделенные из АЖ, способны к длительной пролиферации *in vitro*, и полученные данные по экспрессии маркеров позволяют предположить, что они обладают более широкими дифференцировочными потенциями, чем мезенхимные стволовые клетки, и могут быть перспективны для клеточной терапии.

**Ключевые слова:** амниотическая жидкость, культура клеток, маркеры эпителия, мезенхимные стволовые клетки, нейтральные маркеры, стволовые клетки.

**Список сокращений:** АЖ – амниотическая жидкость; МСК – мезенхимные стволовые клетки; ЭСК – эмбриональные стволовые клетки.

Амниотическая жидкость уже более 70 лет используется в пренатальной диагностике различных генетических заболеваний (Баранов, Кузнецова, 2007). Она содержит гетерогенную популяцию клеток, в числе которых клетки кожи плода, его дыхательной, пищеварительной и выделительной систем, а также клетки амниотической мембраны. Большая часть этих клеток дифференцирована и обладает низким пролиферативным потенциалом (Siddiqyi, Atala, 2004; Tsai et al., 2006). В последнее время появились данные о присутствии в АЖ клеток, способных к длительной пролиферации и дифференцировке в различные типы клеток в условиях *in vitro*. На основании экспрессии в этих клетках таких маркеров, как CD73, CD90, CD105, CD44, CD29, некоторые исследо-

ватели относят их к МСК (Tsai et al., 2004; Sessarego et al., 2008). Вместе с тем в клетках из АЖ выявляются также нейтральные маркеры, такие как Nestin,  $\beta_3$ -tubulin, GFAP, NEFH и некоторые из маркеров ЭСК, например, SSEA-4, Oct4, Nanog (Prusa et al., 2003; Siddiqyi, Atala, 2004; Tsai et al., 2006). Показаны остеогенная, адипогенная, миогенная, нейтральная дифференцировка этих клеток, а также дифференцировка в гепатоциты и эндотелиальные клетки (Tsai et al., 2004; Delo et al., 2006; Tsai et al., 2006; De Coppi et al., 2007; Perin et al., 2008; You et al., 2008; Zheng et al., 2008). Таким образом, имеющиеся данные, с одной стороны, позволяют предположить, что клетки из АЖ по своим способностям к дифференцировке занимают промежуточное положение между эмбриональными и постнатальными

стволовыми клетками, а с другой – оставляют открытым вопрос о возможности присутствия в культуре нескольких различных типов клеток, т.е. о гетерогенности популяции. Ответ на этот вопрос требует дальнейшей детализации структуры популяции, что предполагает расширение сведений о профиле экспрессии генов.

Простой и безопасный способ получения АЖ, сравнительная простота выделения и культивирования клеток, значительно более высокий, чем у постнатальных стволовых клеток, пролиферативный потенциал, низкая иммуногенность, возможность дифференцировать эти клетки в производные трех зародышевых листков, а также тот факт, что трансплантация этих клеток не приводит к образованию тератом – все это говорит о том, что АЖ может стать альтернативным источником клеток для клеточной терапии (Prusa et al., 2003; Delo et al., 2006; Trounson, 2007). Кроме того, возможность получения клеток, экспрессирующих ряд маркеров плюрипотентности, исключает этические проблемы, возникающие при исследованиях ЭСК человека.

Целью нашего исследования было изучение пролиферативного потенциала клеток из АЖ и изучение экспрессии ряда тканеспецифических генов и маркеров стволовых клеток.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Культивирование клеток из АЖ.** Образцы АЖ (10 мл) от трех доноров были любезно предоставлены клиникой акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирёва, ММА им. И.М. Сеченова. Забор осуществляли в ходе амниоцентеза, проведенного на 16–20-й нед беременности для кариотипирования плода. Клетки выделяли центрифугированием (10 мин, 1100 об/мин) и культивировали в среде  $\alpha$ -MEM (Gibco, США) с добавлением 15 % ES-FBS (HyClone, США), 1 % глутамина (Invitrogen, США), 18 % Chang В и 2 % Chang С (Irvine Scientific, США), 1 % пенициллина/стрептомицина (Sigma, США) при 37 °С в атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. Пассирование проводили 1:3 на 2–3-й сут, когда клетки достигали монослоя.

**Проточная цитофлуориметрия.** Экспрессию поверхностных антигенов клеток АЖ (7-й пассаж) оценивали на проточном цитофлуориметре (Becton Dickinson FACS-Calibur, США). Клетки трипсинизировали и окрашивали связанными с флуоресцеин изотиоционатом (FITC) или фикоэритрином (PE) антителами против CD13, CD29, CD44, CD106, CD73, CD54, CD45, CD117, CD34, CD146, CD90, CD105, CD71, HLA-A,B,C, HLA-DR,DP,DQ (BD Pharmingen, США). Контролем служили FITC- или PE-связанные иммуноглобулины тех же изотипов. Для изучения экспрессии клетками кератина использовали мышинные антитела против кератина 19 (Millipore, США) со вторыми антителами Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, США). В качестве контролей использовали окраску без первых антител и изотип-контроль.

**ОТ – ПЦР.** Выделение тотальной РНК производилось с помощью TRI<sup>®</sup> Reagent (Sigma, США) согласно протоколу производителя. мРНК получали с использованием магнитных частиц («Силекс», Россия). Первая цепь кДНК синтезировалась на мРНК с помощью фермента М-MLV обратной транскриптазы («Силекс», Россия). Библио-

теки кДНК нормировали по гену домашнего хозяйства, кодирующему рибосомальный белок RPL19. Праймеры для ПЦР были сконструированы в компьютерной программе DNASTar по нуклеотидной последовательности разных экзонов. Информация о структуре исследуемых генов получена из международной базы данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI, GeneBank, США). Последовательности праймеров представлены в табл. 1. ПЦР со специфическими праймерами проводили с использованием ColoredTaq-полимеразы («Силекс», Россия) на амплификаторе Mastercycler (Eppendorf, Германия). ПЦР-фрагменты разделяли электрофоретически в 1 %-ном агарозном геле и оценивали уровень экспрессии на УФ-анализаторе гелей (@BIO RAD, США).

**Иммуногистохимия.** Для иммуногистохимического анализа клетки 11-го пассажа фиксировали в 4 %-ном параформальдегиде и инкубировали в течение ночи при +4 °С с антителами против CD34 (мышинные, 1:200, Millipore, США), CD105 (мышинные, 1:50; Millipore, США), CD49d (мышинные, 1:50, Millipore, США), STRO-1 (кроличьи, 1:100, R&D Systems, США), кератин 14 (мышинные 1:20, Novocastra, Германия), кератин 19 (мышинные, 1:50; Millipore, США), p63 (мышинные, 1:50; BD Pharmingen, США),  $\beta_3$ -tubulin (мышинные, 1:300, Millipore, США), NF (Neurofilament) (мышинные, 1:10, ICN, США), Pax6 (мышинные, 1:100, Millipore, США). После этого клетки отмывали PBS и инкубировали со вторыми антителами Alexa Fluor 488 или Alexa Fluor 546 (Molecular Probes, США) при комнатной температуре в течение 1 ч. Ядра клеток докрасивали DAPI (VECTASHIELD mounting medium for fluorescence with DAPI, Vector Laboratories, США).

**Трансплантация иммунодефицитным животным.** Для изучения способности клеток АЖ формировать тератомы использовали иммунодефицитных мышей линии Nude (Питомник лабораторных животных «Пушино»). Экспериментальным животным подкожно вводили по 3x10<sup>6</sup> клеток 5-го пассажа в 100 мкл бессывороточной среды  $\alpha$ -MEM (концентрация суспензии 30x10<sup>6</sup> кл/мл). Контрольным животным вводили 100 мкл суспензии клеток стромы жировой ткани человека 2-го пассажа (45x10<sup>6</sup> кл/мл) (отрицательный контроль) или 100 мкл суспензии ЭСК мыши 65-го пассажа (20x10<sup>6</sup> кл/мл) (положительный контроль). В каждой группе было по 3 животных. Животных выводили из эксперимента по мере формирования опухолей (положительный контроль) или через 11 нед после инъекции (экспериментальная группа и отрицательный контроль). Опухоли и органы животных (печень, почка, селезенка, сердце, легкое, семенник) подвергали гистологическому исследованию.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Культура клеток АЖ.** В работе были использовали три образца АЖ от трех доноров. Культивирование проводили в 24-луночных планшетах в среде Chang по ранее описанному методу (De Coppi et al., 2007) с модификациями.

В результате центрифугирования АЖ получали гетерогенную популяцию клеток, большую часть которой представляли клетки плоского эпителия. Мелкие округлые клетки были немногочисленны. Клетки плоского эпителия не прикреплялись к пластику и после первой смены сре-

ды на 5-7-е сут элиминировались из культуры. Напротив, округлые клетки прикреплялись и формировали небольшие колонии, различающиеся по размеру и морфологии клеток (рис. 1). В большинстве колоний клетки были фибробластоподобными, однако некоторые из них были образованы из эпителиоподобных клеток. После первой смены среды фибробластоподобные клетки в колониях начинали активно пролиферировать, в то время как колонии с эпителиоподобными клетками практически не изменялись. На 4-6-е сут после первой смены среды, когда клетки достигали субконфлюэнтного слоя, проводили пассирование, после которого образования колоний не происходило. Клетки равномерно распределялись по дну лунки и в течение 2-3 сут формировали монослой. После пассирования в культуре сохранялись только фибробластоподобные клетки, эпителиоподобные клетки более не наблюдались.

По морфологическим критериям клетки АЖ делятся на 3 типа: эпителиоподобные, специфические для амниотической жидкости клетки и фибробластоподобные (Prusa, Hengstschlager, 2002; Tsai et al., 2004). Первые и вторые появляются в начале культивирования, последние позже. При этом эпителиоподобные клетки быстро исчезают, в то время как два другие типа клеток сохраняются в культуре. Многие авторы предполагают, что именно фибробластоподобные клетки и являются стволовыми, и с учетом экспрессии мезенхимных маркеров, а также спектра возможных дифференцировок этих клеток относят их к МСК. В то же время, помимо фибробластоподобных клеток, в культуре могут сохраняться специфические для АЖ клетки, продуцирующие эстрогены, прогестерон и хорионический гонадотропин. По всей видимости, они являются производными трофобласта и амниотической мембраны. Таким образом, вопрос о происхождении амниотических стволовых клеток все еще остается открытым (Prusa, Hengstschlager, 2002; Tsai et al., 2004).

Следует отметить, что мы анализировали как быстро прикрепляющиеся к пластику клетки, так и клетки с отсроченным прикреплением, поскольку первая смена среды проводилась только через 5-7 сут после начала культивирования. В литературе имеются данные относительно медленно прикрепляющихся клеток (Tsai et al., 2004) и сме-

шанной популяции, которую впоследствии подвергали селекции по экспрессии c-kit (Delo et al., 2006; De Coppi et al., 2007; Perin et al., 2008). Некоторые авторы предполагают, что c-kit положительные клетки из АЖ являются плюрипотентными. В то же время и медленно прикрепляющиеся клетки характеризуются экспрессией широкого спектра маркеров и способны к дифференцировке в различных направлениях.

Показано, что стволовые клетки, выделенные из АЖ, способны претерпевать 350 удвоений популяции, сохраняя при этом недифференцированный статус, высокий пролиферативный потенциал, клоногенность и длину теломерных участков (Siddiqi, Atala, 2004; Delo et al., 2006; Perin et al., 2008). Максимальное число пассажей может достигать 42 (Wang et al., 2008). Мы получили 3 культуры клеток от 3 доноров. К настоящему времени они прошли 20, 18 и 15 пассажей. По данным кариологического исследования, проведенного в лаборатории пренатальной диагностики, аномалий кариотипа у плодов, от которых была взята АЖ, не обнаружено.

**Характеристика фенотипа по экспрессии молекулярных маркеров.** По результатам проточной цитофлуориметрии клетки АЖ экспрессируют мезенхимные маркеры CD90, CD73, CD105, CD13, CD29, CD44, CD146, CD54, CD71 (слабая экспрессия) и не экспрессируют CD106, CD34, CD45 (табл. 2, рис. 2). Эти данные позволяют предположить, что в полученных культурах присутствуют фетальные МСК. Отсутствие экспрессии CD34 и CD45 по данным цитофлуориметрии и иммуногистохимии указывает на то, что в культуре отсутствуют гематопоэтические стволовые/прогениторные клетки. Эти результаты согласуются с данными других авторов, согласно которым гематопоэтические стволовые клетки в большом количестве обнаруживаются в АЖ на ранних сроках беременности (7-12 нед), куда они, по всей видимости, попадают через тонкую стенку желточного мешка, где в это время идет активный гемопоэз (Torricelli et al., 1993). К классическим срокам амниоцентеза (16-20 нед) эти клетки в АЖ уже не обнаруживаются (Siddiqi, Atala, 2004; De Coppi et al., 2007; Perin et al., 2008; Sessarego et al., 2008). Из эпителиальных маркеров с помощью проточной цитофлуориметрии и иммуногистохимии

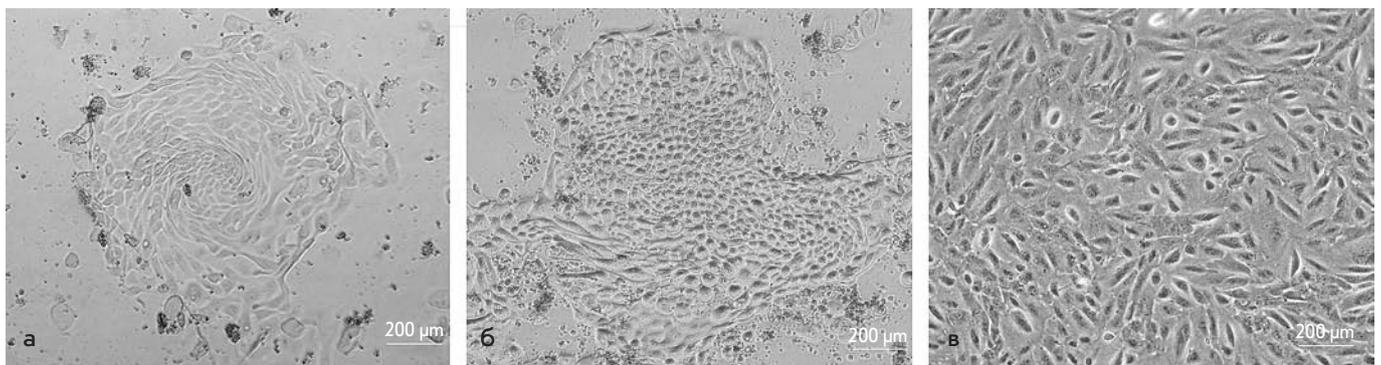


Рис. 1. Клетки АЖ в культуре: а) первичная колония фибробластоподобных клеток, появившаяся в культуре на 9-е сут; б) первичная колония эпителиоподобных клеток, появившаяся в культуре на 9-е сут; в) монослой клеток 8-го пассажа; а, б, в) светлое поле, прижизненное фото



## МЕСТО, ГДЕ РОЖДАЮТСЯ НОВЫЕ ЛЕКАРСТВА

ЦЕНТР ВЫСОКИХ ТЕХНОЛОГИЙ ХИМРАР  
CHEMRAR HI-TECH CENTER

**Центр Высоких Технологий «ХимРар»** – уникальный для РФ негосударственный научно-исследовательский комплекс, объединяющий инновационные высокотехнологичные организации, ведущие разработки для отечественных и зарубежных фармацевтических и биотехнологических производителей.

**Наша миссия** – разработка и выведение на рынок инновационных лекарств на основе новейших «постгеномных» технологий.

### Своим партнерам мы предлагаем:

- П**оиск новых фармакологических субстанций с использованием высокопроизводительных исследовательских платформ, включая компьютерное моделирование, комбинаторную химию и высокопроизводительный скрининг
- Р**азработка инновационных готовых лекарственных форм с использованием нанобиотехнологий, в том числе для препаратов, выходящих из-под патентной защиты
- И**мпортозамещающая разработка инновационных и дженериковых препаратов
- Т**рансфер и доведение в РФ приостановленных на Западе проектов по разработке инновационных препаратов, начиная со стадии поздней доклиники, и с использованием моделей разделения рисков и рынков
- К**омплексные программы локализации фармпроизводств, начиная с «technology transfer» и заканчивая «green-field» проектами

**Организации ЦВТ «ХимРар» приглашают партнеров и инвесторов для совместных клинических исследований и продвижения инновационных лекарственных препаратов в области онкологических и инфекционных заболеваний, а также заболеваний центральной нервной системы.**

[www.chemrar.ru](http://www.chemrar.ru)    Тел.: +7 (495) 225-1191    Факс: +7 (495) 626-9780

Таблица 1. Таблица праймеров

Ген	Нуклеотидная последовательность праймера
Rpl19	5' aggtacagccaatgccca 3' 5' ccttgataaagtctgatgatc 3'
CD90	5' acctggccatcagcatcgct3' 5' gaatccgtggcctggagga 3'
$\beta_3$ -tubulin	5' cagtgccgcaaccagatcgg 3' 5' caggtcagcgttgagctggc 3'
Nestin	5' aggaggatgtaccaccagtgc 3' 5' caccaatgatgtctgccct 3'
Nucleostemin	5' gcatgacctgccataagcgg3' 5' ctgtccactctggacaatggc3'
Rax6	5' gtcataataaacagagttctc 3' 5' cgattagaaaaccatactgtat 3'
Кератин 19	5' gatcgaaggcctgaaggaag3' 5' atgctcagctgtgactgcag3'
p63	5' gagccgtgaattcaacagagg3' 5' tccgaactgtgctttctg3'
CD117 (c-kit)	5' gtggggcagcagattaggctg3' 5' cggcttccacttttgatcatg3'
Oct4	5' cgaccatctgccgctttgag3' 5' cccctgtccccattccta3'
Nanog	5' gtgtggatccagctgtccc 3' 5' ctgctcacaccattgctattc 3'
Rex1	5' gctggagcctgtgtgaacag3' 5' atacataaggccccacccg3'
Stella	5' gctagtgtgtgtcaagac3' 5' ggtgcaagaataagattatggc3'
Sox2	5' acagcccggaccgcgtcaag 3' 5' tctcgagctgtgatggag 3'

Таблица 2. Экспрессия маркеров в клетках из АЖ по данным проточной цитофлуориметрии

Маркер	Проточная цитофлуориметрия <sup>a</sup>
CD 90 (Thy-1)	83 % - 58 % - 70 %
CD 73 (SH3,SH4)	99 % - 99 % - 96 %
CD 105	85 % - 89 % - н/о
CD 13	99 % - 98 % - 87 %
CD 29 (integrin $\beta_1$ )	99 % - 99 % - 99 %
CD 44	99 % - 99 % - 98 %
CD 106 (VCAM-1)	---
CD 54 (ICAM-1)	43 % - 60 % - н/о
CD 146	99 % - 98 % - 90 %
CD 71	36 % - 32 % - н/о
CD 34	---
CD 45	---
Кератин 19	92 % - 70 % - 88 %
HLA-A,B,C	95 % - 87 % - 65 %
HLA- DR,DP,DQ	---

<sup>a</sup> – указан % положительных по исследуемому маркеру клеток для трех культур, соответственно; "----" - экспрессии маркера нет; н/о – не определяли.

был выявлен кератин 19. Из антигенов главного комплекса гистосовместимости присутствовали HLA-A,B,C и отсутствовали HLA-DR,DP,DQ, что совпадает с имеющимися данными по экспрессии этих антигенов в МСК и клетках АЖ (In 't Anker et al., 2004; Tsai et al., 2004; Sessarego et al., 2008; Zheng et al., 2008).

Иммуногистохимический анализ показал, что клетки АЖ экспрессируют не только мезенхимные маркеры, такие как CD105, STRO-1, CD49d, но и нейральные ( $\beta_3$ -tubulin (нейрональный цитоскелет), NF (нейрофиламент в цитоплазме зрелых нейронов), Rax6 (транскрипционный фактор) и эпителиальные (кератин 19, транскрипционный фактор p63) маркеры (табл. 3, рис. 3). Кератин 14, являющийся маркером ороговевающего эпидермиса, в амниотических клетках не обнаружен. Следует отметить, что более 70 % клеток экспрессируют кератин 19 и одновременно с этим более 80 % экспрессируют мезенхимный маркер CD105

и более 95 % клеток – CD73. Это свидетельствует о том, что значительная часть популяции может одновременно экспрессировать два маркера – мезенхимный и эпителиальный. В дальнейшем эти данные требуют подтверждения другими методами. Ранее было показано, что клоны клеток АЖ способны к одновременной экспрессии нейральных и мезенхимных маркеров (Tsai et al., 2006). С другой стороны, имеются данные об экспрессии нейральных маркеров в МСК (Corti et al., 2003; Wislet-Gendebien et al., 2004; Bertani et al., 2005). В то же время экспрессия кератина 19 не характерна для мезенхимных клеток. Таким образом, полученные нами данные не согласуются с предположением о том, что клетки АЖ являются фетальными МСК.

Данные ОТ-ПЦР также подтвердили экспрессию клетками АЖ маркеров мезенхимного (CD90), нейрального ( $\beta_3$ -tubulin, Nestin, Nucleostemin, Rax6) и эпителиального (кератин 19, p63) типов дифференцировки (рис. 4). Кроме

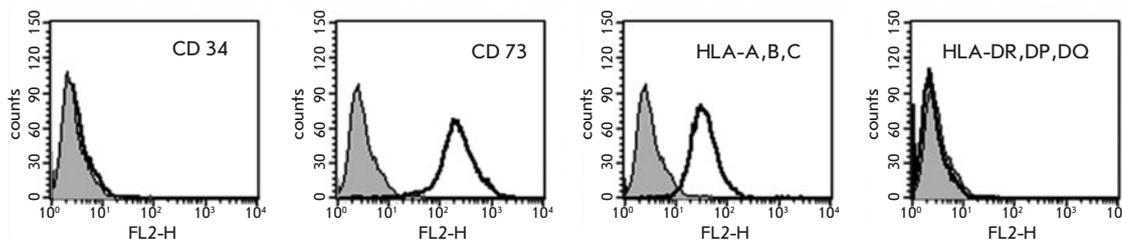


Рис. 2. Результаты анализа экспрессии CD34, CD73, HLA-A,B,C и HLA-DR,DP,DQ по данным проточной цитофлуориметрии

# Акция! Один номер бесплатно

Самоорганизующиеся структуры и  
наносборки

Наноэлектроника

Устройства и изделия на  
основе наноматериалов  
и нанотехнологий

Исследования  
наноуглерода

## Подписка в редакции:

Телефон/ факс:

+7 (495) 930 88 06

E-mail: [podpiska@nanorf.ru](mailto:podpiska@nanorf.ru)

Web-site: [www.nanorf.ru](http://www.nanorf.ru)

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

[www.nanorf.ru](http://www.nanorf.ru)

Российские нанотехнологии –  
ведущий\* научный журнал

\* по данным расчёта импакт-фактора за 2008 год ([elibrary.ru](http://elibrary.ru); данные ИФ РИНЦ от 16.06.2009 г.)

того, с помощью ОТ-ПЦР в этих клетках выявлены поверхностный маркер *c-kit*, гомеобоксный ген *Pitx2* и некоторые маркеры ЭСК – *Oct4*, *Nanog*, *Rex-1*. Эти результаты, а также имеющиеся в литературе данные (Siddiqi, Atala, 2004; Tsai et al., 2006; De Coppi et al., 2007), говорят о более примитивном статусе амниотических стволовых клеток в сравнении с постнатальными и широким спектре их возможных дифференцировок. В то же время экспрессии таких маркеров плюрипотентности, как *Sox2* и *Stella*, в клетках из АЖ не наблюдалось. Скорее всего, этот факт свидетельствует о более ограниченных потенциалах изучаемых нами клеток в сравнении с ЭСК, и, возможно, именно это является причиной того, что при трансплантации клеток АЖ *in vivo* не происходит образования тератом.

**Трансплантация клеток иммунодефицитным животным.** При трансплантации культивированных клеток из АЖ человека иммунодефицитным мышам тератомы не были обнаружены даже через 11 нед, в то время как при введении ЭСК они образовывались уже через 3–4 нед. Эти результаты согласуются с имеющимися в литературе данными, согласно которым и при трансплантации *in vivo* большего числа клеток АЖ (до  $8 \times 10^6$  клеток) тератомы не формируются (De Coppi et al., 2007; Trounson, 2007). Кроме того, показано, что даже через 7 мес. после внутривенного введения этих клеток у экспериментальных животных не появляются неопластические образования (Carrago et al., 2008).

При гистологическом исследовании аномалий органов у животных опытной группы выявлено не было.

Таким образом, нами были получены культуры клеток из АЖ трех доноров. Эти клетки характеризуются экспрессией широкого спектра маркеров, среди которых мезенхимные, нейральные, эпителиальные, а также маркеры плюрипотентности.

По морфологии, поведению в культуре и экспрессии большого числа маркеров мезенхимных клеток можно предположить, что АЖ является источником МСК, которые в настоящее время обнаружены во многих тканях

Таблица 3. Экспрессия маркеров в клетках из АЖ по данным иммуногистохимии

Маркер	Иммуногистохимия
CD 49d (integrin $\alpha_4$ )	+
CD 105	+
STRO-1	+
CD 34	-
Рах6	+
NF	+
$\beta_3$ -tubulin	+
Кератин 19	+
Кератин 14	-
p63	+

«+» – имеется экспрессия маркера;  
«-» – экспрессии маркера нет.

(Campagnoli et al., 2001; Hu et al., 2003; Romanov et al., 2003). Есть сведения о том, что МСК также могут экспрессировать нейральные маркеры. С другой стороны, полученные результаты относительно экспрессии эпителиальных маркеров указывают на возможную гетерогенность полученных культур или на особый статус клеток из АЖ, о чем может свидетельствовать и экспрессия маркеров плюрипотентности. В дальнейшем мы планируем проверить эти предположения.

Имеющиеся данные об экспрессии маркеров, а также о возможных направлениях дифференцировки клеток из АЖ и отсутствие формирования тератом при трансплантации их *in vivo*, дают возможность предположить, что полученные клетки могут быть перспективны в плане

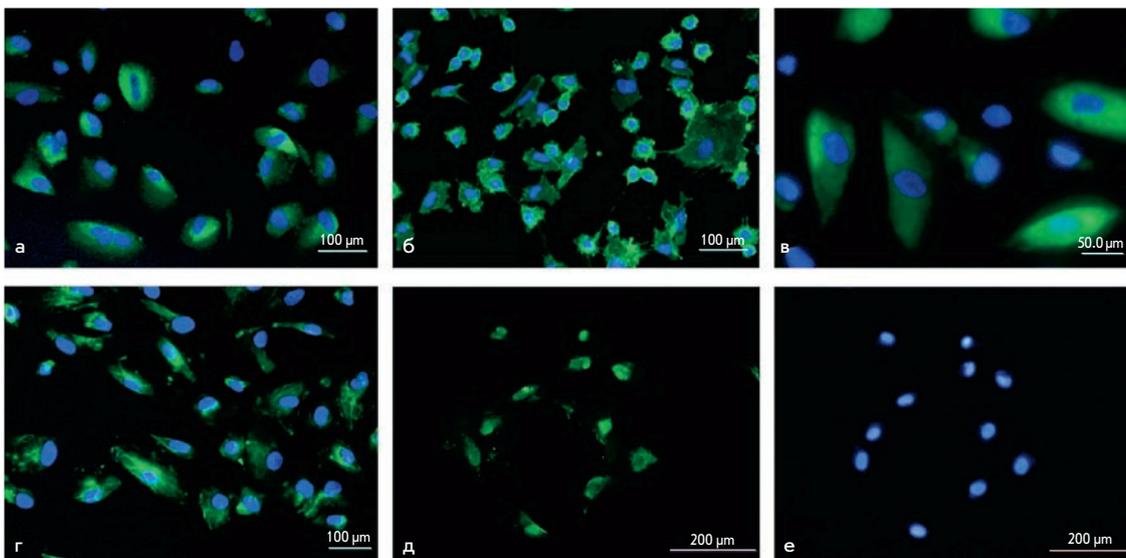


Рис. 3. Иммуногистохимический анализ экспрессии маркеров дифференцировки. Клетки АЖ окрашивали антителами против мезенхимных (а, б), нейральных (в) и эпителиальных (г, д) маркеров. Для визуализации использовали вторые антитела Alexa Fluor 488: зеленая флуоресценция свидетельствует об экспрессии (а) CD105; (б) CD49d; (в)  $\beta_3$ -tubulin; (г) кератина 19; (д) p63; (е) то же, что д, ядра окрашены DAPI (голубой). а, б, в, г) совмещенные фото, ядра окрашены DAPI (голубой).



Рис. 4. Экспрессия маркеров дифференцировки и маркеров стволовых клеток по данным ОТ-ПЦР

клеточной терапии. Предполагается, что клетки АЖ могут быть полезны для восстановлений повреждений спинного мозга, лечения сахарного диабета, болезни Альцгеймера, инфаркта миокарда и др. (Hampton, 2007) При этом они могут быть использованы не только для аутологичных трансплантаций, но и из-за низкой иммуногенности этих клеток могут быть эффективно подобраны пары донор-реципиент. Кроме того, в отличие от других клеток из экстраэмбриональных тканей (клеток плаценты, амниотической мембраны, пуповинной крови), которые становятся доступны

только после родов, клетки из АЖ могут быть получены на 16–20-й нед беременности. Это открывает перспективы для лечения выявленных дефектов развития *in utero* или сразу после рождения (Marcus, Woodbury, 2008; Ye et al., 2009). ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке  
Российского фонда фундаментальных исследований  
(проект 09-04-12132-офи-м).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баранов В.С., Кузнецова Т.В. Цитогенетика эмбрионального развития человека. 2007. С.-Петербург, Н.-Л., 639 с.
2. Bertani N., Matatesta P., Volpi G., Sonogo P., Ferris R. Neurogenic potential of human mesenchymal stem cells revisited: analysis by immunostaining, timelapse video and microarray. 2005. Journal of Cell Science. 118: 3925-3936.
3. Campagnoli C., Roberts I.A., Kumar S., Bennett P.R., Bellantuono I., Fisk N.M. 2001. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver and bone marrow. Blood. 98: 2396-2402.
4. Carraro G., Perin L., Sedrakyan S., Giuliani S., Tiozzo C., Lee J., Turcatel G., De Langhe S.P., Driscoll B., Bellusci S., Minoo P., Atala A., De Filippo R.E., Warburton D. 2008. Human amniotic fluid stem cells can integrate and differentiate into epithelial lung lineages. Stem Cells. 26 (11): 2902-2911.
5. Corti S., Locatelli F., Strazzer S., Guglieri M., Corni G.P. 2003. Neuronal generation from somatic stem cells: current knowledge and perspectives on the treatment of acquired and degenerative central nervous system disorders. Curr. Gene Ther. 3: 247-272.
6. De Coppi P., Bartsch G., Jr, Siddiqui M.M., Xu T., Santos C.C., Perin L., Mostoslavsky G., Serre A.C., Snyder E.Y., Yoo J.J., Furth M.E., Soker S., Atala A. 2007. Isolation of amniotic stem cells with potential for therapy. Nature Biotechnology. 25 (1): 100-106.
7. Delo D.M., De Coppi P., Bartsch G., Jr, Atala A. 2006. Amniotic fluid and placental stem cells. Methods in Enzymology. 419: 426-438.
8. Hampton T. 2007. Stem cells obtained from amniotic fluid. JAMA. 297 (8): 795.
9. Hu Y., Liao L., Wang Q., Ma L., Ma G., Jiang X., Zhao R.C. 2003. Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas. J. Lab. Clin. Med. 141: 342-349.
10. In 't Anker P.S., Scherjon S.A., Kleijburg-van der Keur C., de Groot-Swings G.M.J.S., Claas F.H.J., Fibbe W.E., Kanhai H.H.H. 2004. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. Stem Cells. 22: 1338-1345.
11. Marcus A.J., Woodbury D. 2008. Fetal stem cells from extra-embryonic tissues: do not discard. J. Cell. Mol. Med. 12 (3): 730-742.
12. Perin L., Sedrakyan S., Da Sacco S., De Filippo R. 2008. Characterization of human amniotic fluid stem cells and their pluripotential capability. In: Methods in Cell Biology. Burlington, Elsevier Academic Press, 86: 85-99.
13. Prusa A-R., Hengstschlager M. 2002. Amniotic fluid cells and human stem cell research – a new connection. Med. Sci. Monit. 8 (11): 253-257.
14. Prusa A-R., Marton E., Rosner M., Bernaschek G., Hengstschlager M. 2003. Oct4-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research? Human Reproduction. 18 (7): 1489-1493.
15. Romanov Y.A., Svintsitskaya V.A., Smirnov V.N. 2003. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. Stem Cells. 21: 105-110.
16. Sessarego N., Parodi A., Podestà M., Benvenuto F., Moggi M., Raviolo V., Lituania M., Kunkl A., Ferlazzo G., Bricarelli F.D., Uccelli A., Frassoni F. 2008. Multipotent mesenchymal stromal cells from amniotic fluid: solid perspectives for clinical application. Haematologica. 93 (3): 339-346.
17. Siddiqui M.M., Atala A. 2004. Amniotic fluid-derived pluripotential cells. In: Handbook of Stem Cells. Burlington, Elsevier Academic press, 2: 175-179.
18. Torricelli F., Brizzi L., Bernabei P.A., Gheri G., Di Lollo S., Nutini L., Lisi E., Di Tommaso M., Cariati E. 1993. Identification of hematopoietic progenitor cells in human amniotic fluid before the 12th week of gestation. Ital. J. Anat. Embryol. 98 (2): 119-126.
19. Trounson A. 2007. A fluid means of stem cell generation. Nature Biotechnology. 25 (1): 62-63.
20. Tsai M-S., Lee J-L., Chang Y-J., Hwang S-M. 2004. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. Human Reproduction. 19 (6): 1450-1456.
21. Tsai M-S., Hwang S-M., Tsai Y-L., Cheng F-C., Lee J-L., Chang Y-J. 2006. Clonal amniotic fluid-derived stem cells express characteristics of both mesenchymal and neural stem cells. Biology of Reproduction. 74: 545-551.
22. Wang H., Chen S., Cheng X., Dou Z., Wang H. 2008. Differentiation of human amniotic fluid stem cells into cardiomyocytes through embryonic body formation. Chinese journal of biotechnology. 24 (9): 1582-1587.
23. Wislet-Gendebien S., Bruyère F., Hans G., LePrince P., Moonen G., Rogister B. 2004. Nestin-positive mesenchymal stem cells favour the astroglial lineage in neural progenitors and stem cells by releasing active BMP4. BMC Neuroscience. 5: 33.
24. Ye L., Chang J.C., Lin C., Sun X., Yu J., Kan Y.W. 2009. Induced pluripotent stem cells offer new approach to therapy in thalassemia and sickle cell anemia and option in pre-natal diagnosis in genetic diseases. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 106 (24): 9826-9830.
25. You Q., Cai L., Zheng J., Tong X., Zhang D., Zhang Y. 2008. Isolation of human mesenchymal stem cells from third-trimester amniotic fluid. Int. J. Gynecol. Obstet. 103 (2): 149-152.
26. Zheng Y.B., Gao Z.L., Xie C., Zhu H.P., Peng L., Chen J.H., Chong Y.T. 2008. Characterization of hepatogenic differentiation of mesenchymal stem cells from human amniotic fluid and human bone marrow: a comparative study. Cell Biology International. 32 (11): 1439-1448.

# Правила для авторов

## ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Журнал «Acta Naturae» публикует экспериментальные и обзорные статьи, а также проблемные 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.

Редакция журнала «Acta Naturae» просит авторов руководствоваться приведенными ниже правилами. Статьи, оформленные без соблюдения этих правил, возвращаются авторам без рассмотрения.

Максимальный объем обзора вместе с таблицами и списком литературы 60 000 знаков (примерно 40 стр., 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 стр. формата А4 вместе с таблицами и списком литературы). Число рисунков не должно превышать 10. Статьи большого 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 стр. формата А4 вместе с таблицами и списком литературы не больше 12 источников). Число рисунков не должно превышать четыре.

Рукопись следует оформить набором файлов – текст, реферат, список цитируемой литературы, подписи к рисункам, таблицы – в формате Microsoft Word 2003 for Windows, рисунки в формате JPG или TIF, каждый рисунок оформляется отдельным файлом.

Рукопись направляется в редакцию в виде электронной версии. В качестве электронных носителей могут использоваться CD-ROM.

## ОФОРМЛЕНИЕ РУКОПИСЕЙ

Рукопись должна быть построена следующим образом:

УДК в левом верхнем углу, шрифт – курсив, размер 9.

Название статьи. Заглавие не должно быть слишком длинным или коротким и малоинформативным. Оно должно отражать главный результат, суть и новизну работы.

Инициалы и фамилии авторов. Автор, ответственный за переписку с редакцией, включая работу с корректурой, выделяется сноской, внизу первой страницы рукописи приводится электронный адрес для переписки.

Полное название научной организации и ее ведомственная принадлежность.

Реферат. Структура реферата должна быть четкой и отражать следующее: постановка проблемы; описание экспериментальных методов, возможность практических приложений, возможности постановки новых задач. Средний объем реферата составляет 20 строк.

Ключевые слова. В них следует отразить: предмет исследования, метод, объект, специфику данной работы.

Список сокращений.

Заглавие статьи на английском языке.

Фамилии и инициалы авторов в английской транскрипции с пометками, указывающими на организацию, в которой работают авторы.

Полное название научной организации и ее ведомственная принадлежность на английском языке.

Введение.

Раздел «Экспериментальная часть».

Раздел «Результаты и обсуждения».

Раздел «Выводы». В конце раздела указываются названия организаций, финансировавших работу, в скобках – номера грантов.

Раздел «Список литературы». Ссылки в тексте на цитируемую литературу даются в квадратных скобках, например [1].

Реферат на английском языке, являющийся переводом аннотации (резюме) на русском языке.

## 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», набираются следующим образом: 02.05.1991, 26.12.1874 и т.п.

Точка не ставится после: «УДК», заглавия статьи, авторов, адресов, заголовков и подзаголовков, названий таблиц, подписей к рисункам, размерностей (с – секунда, г – грамм, мин – минута, ч – час, сут – сутки, град – градус).

Точка ставится после: сноска (в том числе в таблицах), примечаний к таблице, краткой аннотации, сокращений (мес. – месяц, г. – год, т. пл. – температура плавления) (но не ставится в подстрочных индексах:  $T_m$  – 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  $\mu M$ ; нм, но не nm).

Знак « $\rightarrow$ » (тире) отбивается пробелами, знаки «минус», «интервал», или «химическая связь» пробелами не отбиваются.

В качестве знака умножения используется только « $\times$ ». Знак « $\times$ » ставится только в том случае, если справа от него стоит число. Символом « $\ast$ » обозначаются комплексные соединения в химических формулах, а также нековалентные комплексы (ДНК-РНК и т.п.). Используются только «кавычки», но не "кавычки". Числовой материал представляется в виде таблиц.

В формулах используются буквы латинского и греческого алфавитов.

Латинские названия родов и видов живого мира пишутся курсивом, таксонов более высокого ранга – прямым шрифтом. Названия вирусов и бактерий фагов в латинской транскрипции пишутся прямым шрифтом. Названия генов (кроме обозначения генов дрожжей) пишутся строчным курсивом, названия белков – прямым шрифтом.

Названия нуклеотидов (A, T, G, C, U), аминокислотных остатков (Arg, Ile, Val и т.д.) и фосфатов (ATP, AMP и т.д.) пишутся в латинской транскрипции прямым шрифтом.

Нумерация азотистых оснований и аминокислотных остатков пишется без дефиса (T34, Ala89).

При выборе единиц измерения необходимо придерживаться международной системы единиц СИ.

Молекулярная масса выражается в дальтонах (Да, кДа, МДа).

Количество пар нуклеотидов обозначается сокращениями (п.н., т.п.н.).

Количество аминокислотных остатков обозначается сокращением (а.о.).

Биохимические термины (в частности, названия ферментов) приводятся в соответствии с международными правилами IUPAC.

Сокращения терминов и названий в тексте должны быть сведены к минимуму.

Повторение одних и тех же данных в тексте, таблицах и графиках недопустимо.

## ТРЕБОВАНИЯ К ИЛЛУСТРАЦИЯМ

Рисунки к статьям приводятся отдельными файлами.

Иллюстрации должны иметь разрешение не ниже 300 dpi для цветных и полутоновых изображений и не менее 600 dpi для черно-белых иллюстраций

Недопустимо сохранение в файлах неиспользуемых путей отбравок и дополнительных каналов (Path и Alpha Channel), также недопустимо использование дополнительных слов.

Форматы файлов – Adobe Photoshop до 7.0. включительно TIFF, JPG.

## 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 при необходимости 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.

Решением редакционной коллегии статья может быть отклонена, если она не удовлетворяет перечисленным выше требованиям.

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.

Возвращение рукописи авторам на доработку не означает, что статья принята к печати. После получения доработанного текста рукописи вновь рассматривается редколлегией. Доработанный текст автор должен вернуть вместе с первоначальным экземпляром статьи, а также ответами на все замечания. Датой поступления считается день получения редакцией окончательного варианта статьи.

Переработанная рукопись должна быть возвращена в редакцию в течение одной недели после получения авторами отзыва; в противном случае рукопись рассматривается как вновь поступившая.

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.

После сдачи очередного выпуска журнала на макетирование редакция рассылает авторам по электронной почте корректуры статей в виде PDF файла.

На стадии корректуры не допускаются замены текста, рисунков или таблиц. Если это все же необходимо, то данный вопрос решается редколлегией.

## ОФОРМЛЕНИЕ ССЫЛОК

Для книг: фамилия и инициалы автора, полное название книги, место издания, издательство, год издания, том или выпуск и общее количество страниц.

Для периодических изданий: фамилия и инициалы автора, название журнала, год издания, том, номер, первая и последняя страницы статьи. Bressanelli S., Tomei L., Rousset A., et al // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. P. 13034–13039 (если авторов больше пяти). Если авторов меньше пяти, указываются все авторы.

Ссылки на книги, переведенные на русский язык, должны сопровождаться ссылками на оригинальные издания с указанием выходных данных.

Ссылки на авторефераты диссертаций должны содержать фамилию и инициалы автора, название диссертации, место выполнения работы, год защиты диссертации.

Ссылки на патенты должны содержать фамилию и инициалы авторов, вид патентного документа (авторское свидетельство или патент), номер, название страны, выдавшей документ, индекс международной классификации изобретений, год выдачи патента.

Список литературы печатается на отдельной странице.

Таблицы печатаются на отдельной странице.

Подписи к рисункам печатаются на отдельной странице.

Для связи с редакцией следует использовать следующие электронные адреса: rpeetrov@strf.ru, vera.norre@gmail.com, vsychev@strf.ru, тел.: (495) 727-38-60, (495) 930-80-05