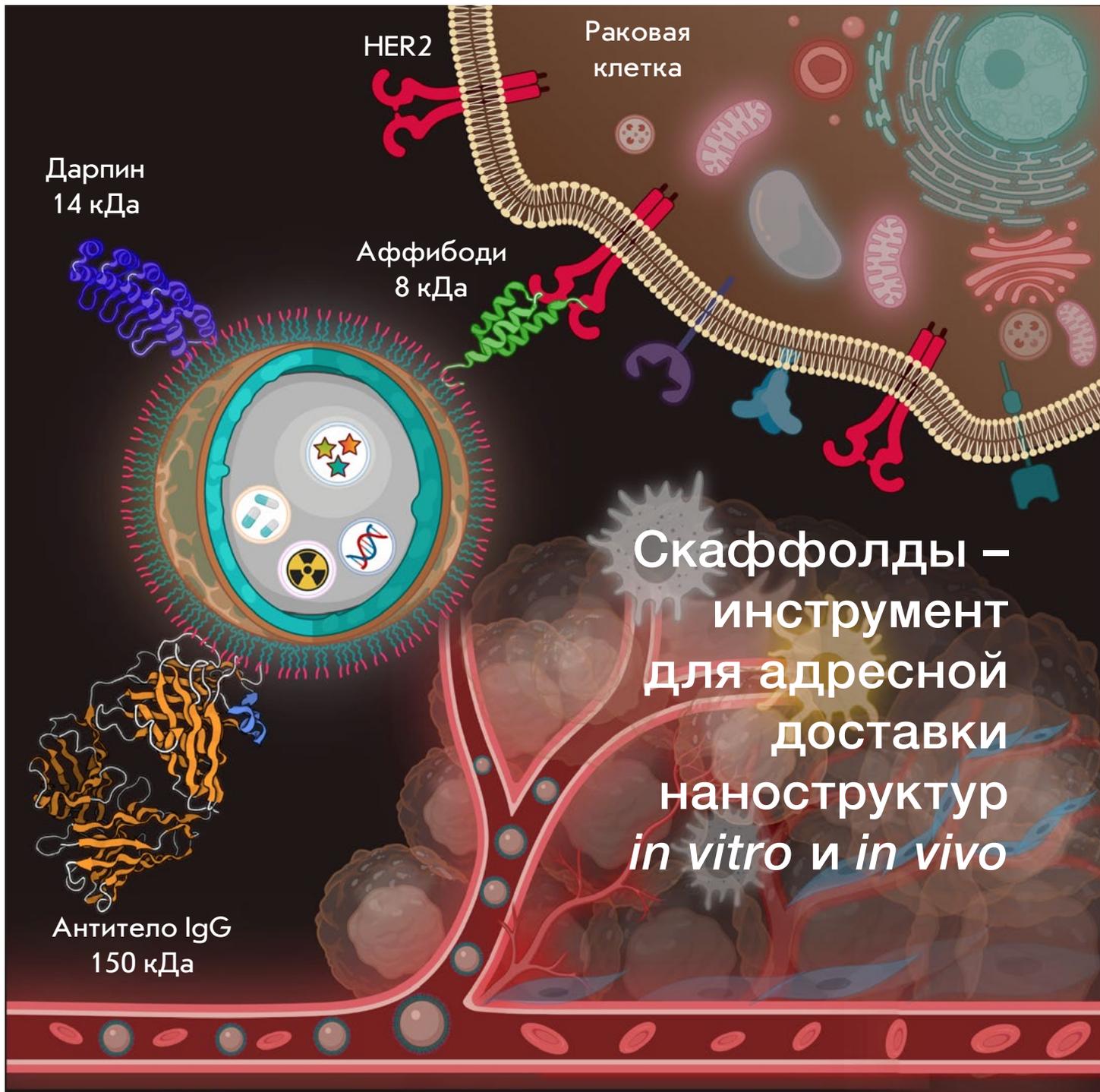
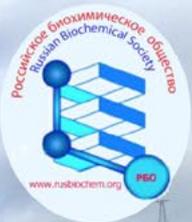
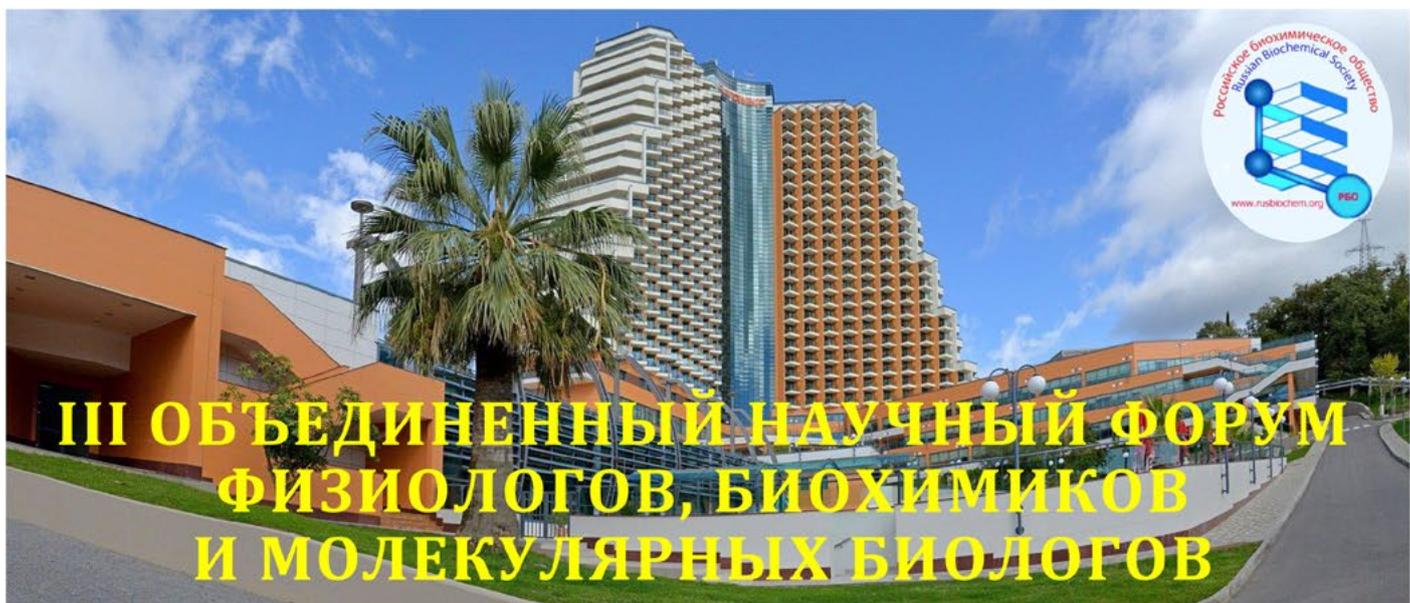


Acta Naturae





III ОБЪЕДИНЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ФОРУМ ФИЗИОЛОГОВ, БИОХИМИКОВ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ

VII СЪЕЗД БИОХИМИКОВ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ РОССИИ X РОССИЙСКИЙ СИМПОЗИУМ «БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ»

Сочи, гостиничный комплекс «Дагомыс»

3–7 апреля 2022

ОРГАНИЗАТОРЫ ФОРУМА

- ◆ Российская академия наук
- ◆ Российское физиологическое общество им. И.П. Павлова
- ◆ Российское общество биохимиков и молекулярных биологов (Российское биохимическое общество)
- ◆ Российский научный фонд
при участии
- ◆ Союза физиологических обществ стран СНГ

СОПРЕДСЕДАТЕЛИ ПРОГРАММНОГО КОМИТЕТА

академики РАН

А.Г. Габибов, М.А. Островский

СБОРНИК ТЕЗИСОВ ДОКЛАДОВ ПРЕДСТАВЛЕН НА САЙТЕ
РОССИЙСКОГО ОБЩЕСТВА БИОХИМИКОВ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ

http://www.rusbiochem.org/sbornik_tezisov.html

ОЗНАКОМИТЬСЯ СО СПИСКОМ ПРИНЯТЫХ УСТНЫХ И СТЕНДОВЫХ ДОКЛАДОВ
МОЖНО НА СТРАНИЦЕ САЙТА

<http://www.rusbiochem.org/page226.html>

Справки по e-mail: info@rusbiochem.org

WWW.RUSBIOCHEM.ORG

50 лет изучения протонифоров: разобщение митохондрий как основа терапевтического действия

Е. А. Котова, Ю. Н. Антоненко

Протонифоры – соединения, осуществляющие электрогенный перенос ионов водорода через мембраны, активно изучаются в течение последних 50 лет в связи со способностью разобщать перенос электронов и синтез АТФ в митохондриях и хлоропластах. В настоящем обзоре рассмотрена возможность вовлечения некоторых белков внутренней мембраны митохондрий в процесс разобщения. Сделан вывод о важности детального изучения механизма работы разобщителей для их более успешного фармакологического применения.

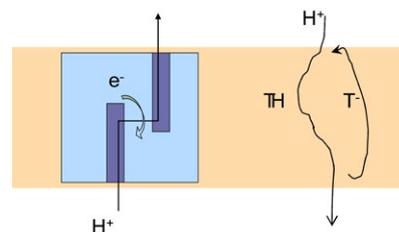


Схема классического протонифорного действия анионного разобщителя Т

Тандемные дубликации экзонов расширяют репертуар альтернативного сплайсинга

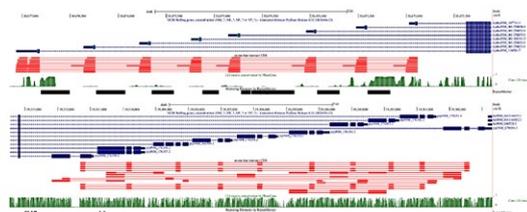


Диаграмма тандемных экзонных дубликаций в генах *hydra* и *pip*

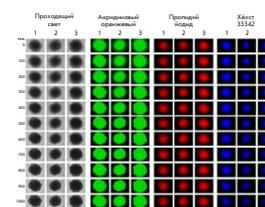
Т. М. Иванов, Д. Д. Первушин

Тандемные дубликации экзонов, обеспечивающие механизм адаптивной регуляции функций белков, играют важную роль в эволюции эукариотических генов. Рассмотрена проблема идентификации тандемных дубликаций экзонов в эукариотических генах и показано, что тандемно дублицированные экзоны широко распространены не только в кодирующих частях генов, но и в нетранслируемых областях. Приведен ряд примеров тандемных дубликаций экзонов, идентифицированы неаннотированные тандемно дублицированные экзоны, представлены статистические свидетельства их экспрессии с использованием больших панелей экспериментов секвенирования РНК.

Метод получения трехмерных клеточных сфероидов: универсальный инструмент для изучения цитотоксических свойств противоопухолевых соединений *in vitro*

А. С. Согомонян, В. О. Шипунова, В. Д. Соловьев, В. И. Ларионов, П. А. Котельникова, С. М. Деев

Разработан универсальный метод 3D-культивирования клеток млекопитающих на основе многоразовых форм, позволяющий воспроизводимо получать мультиклеточные сфероиды с плотными контактами для задач молекулярной и клеточной биологии, а также прогнозирования функциональной активности различных соединений *in vivo*.

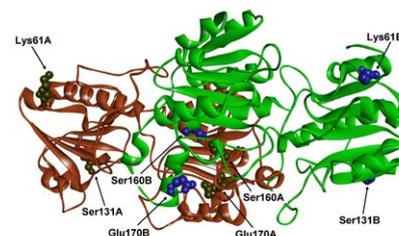


Визуализация сфероидов SKOVip-kat

Влияние дополнительных аминокислотных замен на свойства многоточечной мутантной бактериальной формиаатдегидрогеназы PseFDH SM4S

А. А. Пометун, П. Д. Паршин, Н. П. Галаничева, Л. А. Шапошников, Д. Л. Атрошенко, Е. В. Пометун, В. В. Бурмакин, С. Ю. Клейменов, С. С. Савин, В. И. Тишков

Формиаатдегидрогеназа из бактерий *Pseudomonas* sp. 101 (PseFDH) представляет большой интерес для науки и практики. В работе использовали многоточечный мутант PseFDH SM4S с улучшенными каталитическими параметрами и повышенной температурной и химической стабильностью. В него были дополнительно введены пять замен, обеспечивающих увеличение стабильности фермента дикого типа. Показано, что замена E170D синергична с ранее введенными мутациями: увеличение термостабильности мутанта было в 2 раза выше по сравнению с ферментом дикого типа.



Положения остатков Lys61, Ser131, Ser160 и Glu170 в структуре апо-формы FDH из *Pseudomonas* sp. 101

Acta Naturae

ТОМ 14, № 1 (52), ЯНВАРЬ—МАРТ 2022
издается с апреля 2009 года

Учредители:

ООО «Акта Натурэ»,
Национальный исследовательский университет
«Высшая школа экономики»

Редакционный совет:

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

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

Редакционная коллегия:

Ответственный секретарь: В.Д. Кнорре

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

Руководитель проекта: Н.В. Соболева
Выпускающий редактор: Н.Ю. Деева
Подготовка иллюстраций: К.К. Опарин
Верстка: К.К. Опарин
Корректурa: Р.С. Шаймарданова
Дизайн-проект: Х. Шнайдер
WEB-редактор: О.Б. Семина

Адрес редакции: 101000, Москва, ул. Мясницкая, 13, стр. 4
Телефон/факс: +7 (495) 727 38 60
E-mail: actanaturae@gmail.com

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, 2022

Номер подписан в печать 29 марта 2022 г.
Тираж 25 экз. Цена свободная.
Отпечатано в типографии: НИУ ВШЭ,
г. Москва, Измайловское шоссе, 44, стр. 2

Включен в базы данных PubMed,
Web of Science, Scopus, РИНЦ

Журнал Acta Naturae входит
в Перечень ведущих периодических
изданий Высшей аттестационной комиссии
Минобрнауки России

Выходит 4 раза в год

Импакт-фактор: 1.845

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

- Е. А. Котова, Ю. Н. Антоненко
**50 лет изучения протонофоров:
разобщение митохондрий как основа
терапевтического действия** 4
- А. А. Моралева, А. С. Дерябин,
Ю. П. Рубцов, М. П. Рубцова, О. А. Донцова
**Биогенез эукариотических рибосом:
40S субъединица** 14
- Л. А. Ромодин
**Хемилюминесценция в исследовании свобод-
норадикальных реакций.
Часть 2. Люминесцирующие добавки
для увеличения квантового выхода
хемилюминесценции** 31
- О. С. Троицкая, Д. Д. Новак, В. А. Рихтер,
О. А. Коваль
**Иммуногенная гибель опухолевых клеток
в терапии онкологических заболеваний** 40

В. О. Шипунова, С. М. Деев Распознающие скаффолдовые полипептиды как инструмент для адресной доставки наноструктур <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	54
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Т. М. Иванов, Д. Д. Первушин Тандемные дубликации экзонов расширяют репертуар альтернативного сплайсинга	73
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

А. А. Пометун, П. Д. Паршин, Н. П. Галаничева, Л. А. Шапошников, Д. Л. Атрошенко, Е. В. Пометун, В. В. Бурмакин, С. Ю. Клейменов, С. С. Савин, В. И. Тишков Влияние дополнительных аминокислотных замен на свойства многоточечной мутантной бактериальной формиатдегидрогеназы PseFDH SM4S	82
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

А. С. Согомоян, В. О. Шипунова, В. Д. Соловьев, В. И. Ларионов, П. А. Котельникова, С. М. Деев Метод получения трехмерных клеточных сфероидов: универсальный инструмент для изучения цитотоксических свойств противоопухолевых соединений <i>in vitro</i>	92
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Д. А. Черемохин, Х. Шинвари, С. С. Дерябина, М. А. Болков, И. А. Тузанкина, Д. А. Кудлай Анализ уровней TREC и KREC в образцах сухой крови новорожденных разного гестационного возраста и веса ...	101
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Ф. С. Шарко, А. Хатиб, Е. Б. Прохорчук Геномная оценка племенной ценности молочных коров черно-пестрой породы по совокупности признаков молочной продуктивности и признаков фертильности	109
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Правила для авторов	123
---------------------------	-----

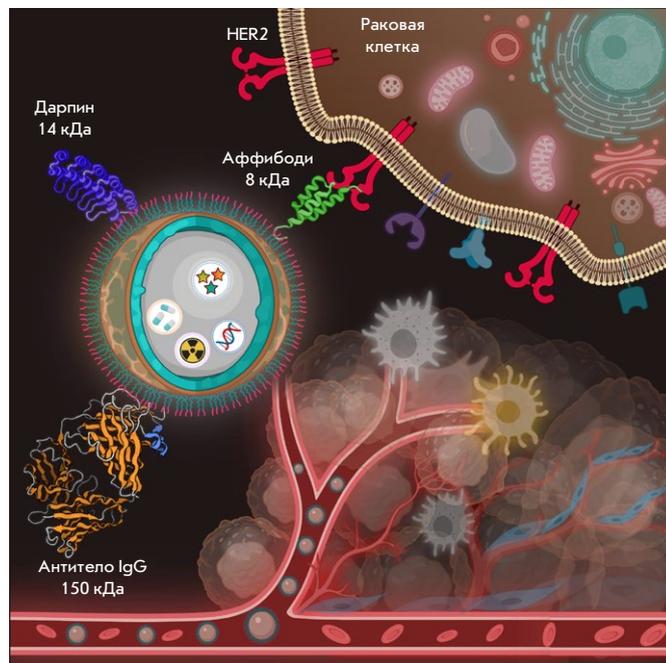


РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ
(см. статью Шипуновой и др.)

УДК 577.24

50 лет изучения протонофоров: разобшение митохондрий как основа терапевтического действия

Е. А. Котова, Ю. Н. Антоненко*

НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

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

Поступила в редакцию 19.10.2021

Принята к печати 21.12.2021

DOI: 10.32607/actanaturae.11610

РЕФЕРАТ Протонофоры – соединения, осуществляющие электрогенный перенос ионов водорода через мембраны, – активно изучаются в течение последних 50 лет в связи со способностью разобщать перенос электронов и синтез АТФ в митохондриях и хлоропластах. Считается, что в основе действия на митохондрии таких классических разобщителей, как DNP и CCCP, лежит их протонофорная активность, т.е. способность переносить протоны через липидную часть митохондриальной мембраны. Учитывая недавно выявленные отклонения от корреляции протонофорной активности ряда разобщителей на искусственных липидных мембранах с их способностью стимулировать дыхание митохондрий, в настоящем обзоре рассмотрена возможность вовлечения некоторых белков внутренней мембраны митохондрий, таких, например, как АТФ/АДР-антипортер, дикарбоксилатный переносчик, АТФ-аза, в процесс разобщения. Важно подчеркнуть, однако, что эти отклонения не противоречат теории Митчелла, а свидетельствуют о более сложном характере взаимодействия DNP, CCCP и других разобщителей с мембранами митохондрий. Сделан вывод о важности детального изучения механизма работы разобщителей для их более успешного фармакологического применения, связанного как с их антибактериальным (включая противотуберкулезное) и противоопухолевым, так и кардио-, нейро-, и нефропротекторным действием.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА разобщители окислительного фосфорилирования, митохондрии, транспорт протонов, биоэнергетика.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ DNP – 2,4-динитрофенол; CCCP – карбонилцианид-*m*-хлорфенилгидразон; БЛМ – бислойная липидная мембрана; P-vs-U-корреляция – корреляция разобщающей активности различных соединений на митохондриях и протонофорной активности на бислойной липидной мембране; Катр – карбоксиатрактилозид; mitoFluo – конъюгат флуоресцеина и трифенилфосфония.

ВВЕДЕНИЕ

Впервые термин протонофор (protonophore) был использован в обзоре Скулачева, опубликованном в 1970 году [1], однако открыты протонофоры были несколькими годами ранее в лабораториях Ленинджера (1966 г. [2]), Скулачева [3] и Либермана [4]. В этих работах показано, что некоторые вещества, ранее идентифицированные как разобщители окислительного фосфорилирования в митохондриях, увеличивают протонную проводимость липидных мембран. Такое наблюдение находилось в согласии с теорией Митчелла о сопряжении окисления и фосфорилирования в митохондриях посредством образования разности электрохимических потенциалов ионов водорода [5]. В случае мембран митохондрий сам Митчелл в 1967 году наблюдал перенос протонов некоторыми разобщителями [6].

Как уже упомянуто, термин протонофор был предложен в 1970 году [1]; до этого разобщители называли proton conductors, или H^+ carriers [2]. Было бы несправедливым не упомянуть работу 1967 года [7] об увеличении протонной проводимости липосом под действием разобщителей, однако эта работа не имела такого резонанса, как публикация в журнале Nature [3]. Приоритет группы Скулачева в открытии протонофоров закреплен также публикацией в журнале Nature 1969 года [8], где прослеживалась количественная корреляция между протонофорной активностью на липидных мембранах (плоских бислоях, БЛМ) и стимуляцией дыхания митохондрий в состоянии 4 (P-vs-U-корреляция) большого ряда разобщающих соединений различной химической природы. Эта работа 1969 года [8] на настоящий момент считается классической. Следует

сказать, что термин ионофор (ionophore), обозначающий вещество, переносящее ионы через мембраны, появился раньше и активно использовался в работах Прессмана с середины 60-х годов прошлого века [9]. Однако Прессман сосредоточился на транспорте ионов металлов и не употреблял термин протонофор. В описываемое время в русскоязычных статьях часто использовали термин мембраноактивный комплексон [10], позднее вытесненный термином ионофор.

Перечисленные работы вызвали взрыв интереса к протонофорам и вместе с последующими работами внесли весомый вклад в доказательство хемиосмотической теории Митчелла. Следует сказать, что P-vs-U-корреляция была сразу оспорена работами другой группы [11], в которых зарегистрированы значительные отклонения от нее при использовании другого набора соединений. Противоречий добавили и Ваккер и соавт., которые показали, что P-vs-U-корреляция намного лучше соблюдается на липосомах, чем на плоских БЛМ [12]. Однако в 1980 году вышел основополагающий обзор [13], авторы которого отстаивали существование хорошей P-vs-U-корреляции, а некоторые противоречия приписывали особенностям физико-химических свойств использованных соединений. Поскольку к тому времени хемиосмотическая теория уже считалась доказанной, вопрос потерял свою актуальность и был практически закрыт, несмотря на то, что к тому моменту уже накопилось достаточно данных, которые указывали на участие белков митохондрий

в действии разобщителей. Показано, в частности, что инкубация азидо-производного DNP (2-azido-4-nitrophenol, NPA) и азидо-производного СССР (2-nitro-4-azidocarbonylcyanide phenylhydrazone, N3ССР) с митохондриями в ответ на освещение приводит к ковалентному пришиванию этих соединений в первом случае к белку, входящему в АТФ-азный комплекс [14], а во втором – к неидентифицированному белку с другой молекулярной массой [15]. Существенно, что такая ковалентная модификация не затрагивала другие белки митохондрий. Однако в то время считалось, что подобные работы идут вразрез с практически доказанной хемиосмотической теорией Митчелла, поэтому им не уделялось достаточного внимания. Интересно, что несколько позже (90-е годы прошлого века) появились работы из лаборатории Скулачева, которые указывали на чувствительность эффекта DNP и СССР к ингибиторам, действующим либо через конкретные белки митохондрий, либо через неидентифицированные белки [16, 17].

ПРОТОНОФОРЫ И ЛИПИДНЫЕ МЕМБРАНЫ

Классические протонофоры представляют собой органические кислоты с рКа вблизи физиологических значений рН, имеющие обширную систему п-электронов, способных, как считается, делокализовать отрицательный заряд, который препятствует проникновению через гидрофобный слой мембраны (рис. 1). Это позволяет анионной форме протонофора (Т⁻) пересекать мембрану в ответ на приложе-

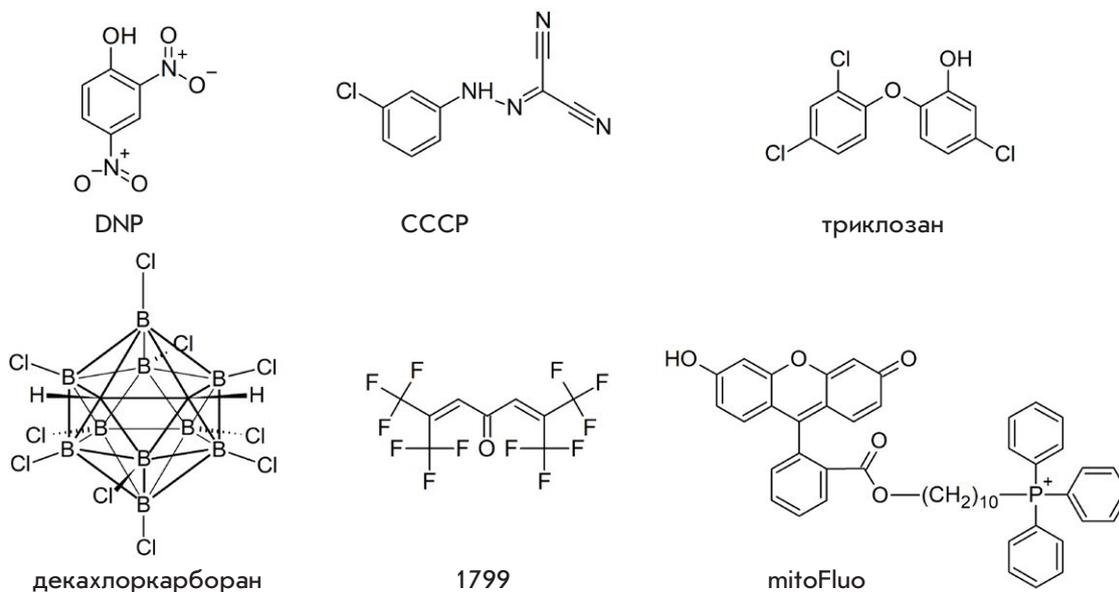


Рис. 1. Химические структуры типичных (верхний ряд) и нетипичных протонофоров (нижний ряд). DNP – 2,4-динитрофенол; СССР – карбонилцианид-м-хлорфенилгидразон; триклозан – 2-(2,4-дихлорфенокси)-3-хлорфенол; декахлоркарборан; 1799 – α,α'-бис[бис(трифторметил)метилена]ацетон; mitoFluo – конъюгат флуоресцеина и трифенилфосфония

ние потенциала, далее протонироваться (переходя в ТН-форму) и двигаться в противоположную сторону в нейтральной форме по градиенту концентрации. Завершает цикл стадия депротонирования ТН-формы. Помимо фенолов (DNP, пентахлорфенол и др.), среди первых протонаторов были изучены разные гидразоны (СССР, FCCP), бензимидазолы (ТТФВ и DTFB), дикумарол, а также салициловая кислота. Эти соединения, представляющие собой слабые ароматические кислоты, хорошо укладываются в общее представление о структуре протонаторов, описанное выше. Однако уже среди первых протестированных разобщителей имелись «экзотические» примеры, такие, как декахлоркарборан [18] и соединение 1799 (α, α' -bis(hexafluoroacetyl)-acetone) [11]. Эти соединения, строго говоря, не являются ароматическими, более того, их способность депротонироваться в водной среде также вызывает большие вопросы. Более поздние работы выявили катионные протонаторы [19–21] и цвиттер-ионные протонаторы [22–24].

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРОТОНАТОРОВ С БЕЛКАМИ ВНУТРЕННЕЙ МЕМБРАНЫ МИТОХОНДРИЙ

С момента появления первых работ по протонаторам прошло около 50 лет, за это время найдено много разнообразных новых низкомолекулярных соединений, которые обладали свойствами разобщителей. Многие из них рассмотрены в обзоре [25], хотя этот список далеко не полный и его следовало бы существенно расширить. К сожалению, не все новые соединения протестированы в липидных системах (БЛМ или липосомах), еще меньшее число веществ охарактеризовано в одинаковых условиях. Однако большое количество данных позволяет существенно продвинуться в уточнении P-vs-U-корреляции по сравнению с первыми работами 70-х годов прошлого века. Так, найдено несколько веществ, которые проявляли выраженное разобщающее действие на митохондриях и при этом практически не обладали протонаторными свойствами на липидных мембранах. Самыми известными среди них и к тому же физиологически важными являются жирные кислоты. Важно подчеркнуть, что жирные кислоты вызывают увеличение протонной проницаемости мембран митохондрий [26, 27]. При этом они обладают лишь очень слабой способностью увеличивать проводимость плоских БЛМ: заметные токи обнаружены лишь на мембранах, сформированных из липосом [28] по методу Монтала [29]. В дальнейшем было показано, что жирные кислоты способны взаимодействовать с ADP/ATP-антипортером [16, 30–32], а также с другими транспортными белками семейства SLC25 [33], что приводит к катализу

переноса аниона жирной кислоты через мембрану митохондрий. Разобщающими свойствами обладают многие противовоспалительные препараты [34] и ряд других соединений [35]. Таким образом, ставшая классической P-vs-U-зависимость может быть заметно расширена. С другой стороны, на современном этапе можно сделать вывод о том, что наблюдаемая корреляция протонаторной активности на БЛМ и митохондриях оказывается довольно слабой и вряд ли противоречит участию белков в протонаторном действии на митохондриях. На рис. 2 данная корреляция представлена согласно [8], с добавлением в качестве примера нескольких веществ, которые показывают, насколько велики могут быть отклонения от канонической P-vs-U-зависимости (красные стрелки).

К соединениям, эффективно разобщающим митохондрии, но практически не увеличивающим протонной проводимости БЛМ, можно также отнести недавно синтезированный конъюгат флуоресцеина и трифенилфосфония, названный mitoFluo [22]. mitoFluo обладает очень слабыми протонаторными свойствами на БЛМ, что ожидаемо, поскольку

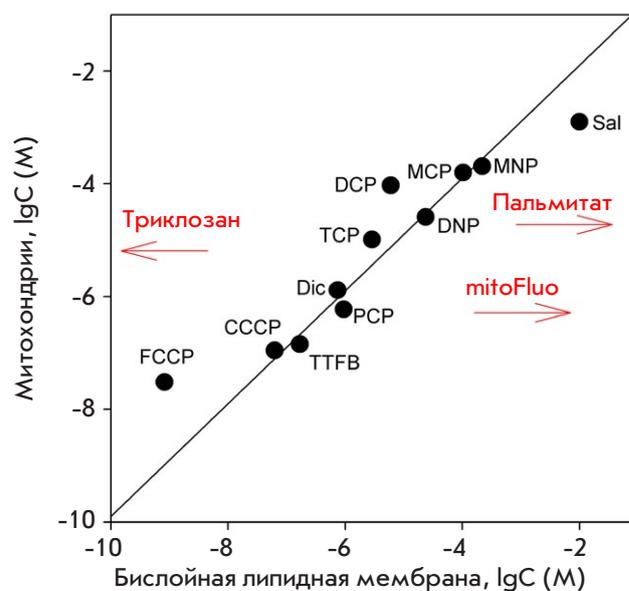


Рис. 2. Корреляция разобщающей активности различных соединений на митохондриях и протонаторной активности на бислойной липидной мембране (БЛМ), полученная в работе [8]. По оси ординат отложены концентрации, которые стимулировали в 2 раза дыхание митохондрий печени крысы в присутствии сукцината как субстрата, по оси абсцисс – концентрации, стимулирующие проводимость БЛМ до уровня $5 \times 10^{-9} \text{ Ом}^{-1} \text{ см}^{-2}$. Красными стрелками указаны уровни эффективных концентраций пальмитата, mitoFluo и триклозана согласно результатам работ [22, 40, 57]

он может быть либо катионом, либо цвиттер-ионом. Катионы гораздо хуже анионов проникают через БЛМ из-за наличия дипольного потенциала, обусловленного слоем диполей на поверхности раздела мембрана–вода [36–38]. Цвиттер-ионы несут, помимо положительного, еще и отрицательный заряд на молекуле, что должно дополнительно снижать их проницаемость. Для регистрации тока БЛМ, индуцированного mitoFluo, пришлось использовать специальные синтетические липиды, которые имеют не сложноэфирные связи с углеводородными остатками, а простые эфирные связи. Ранее было показано, что у таких липидов резко снижен дипольный потенциал мембраны [39]. Но даже на БЛМ, сформированной из такого липида, при pH 7 mitoFluo не вызывал тока протонов, который появлялся лишь при снижении pH и достигал максимума при pH 3 [22]. При этом mitoFluo, действующий как эффективный разобщитель на митохондриях, работает в субмикромольных концентрациях. На другом полюсе веществ, выпадающих из P-vs-U-корреляции, находится триклозан (2,2,4'-trichloro-2'-hydroxydiphenyl ether, *рис. 2*, левая красная стрелка). В отличие от жирных кислот или mitoFluo, триклозан является мощным протонофором на БЛМ (его действующие концентрации значительно меньше по сравнению с СССР) [40]. В то же время триклозан – слабый разобщитель на митохондриях, и для стимуляции дыхания митохондрий требуются десятки микромолей этого вещества [41]. Триклозан широко используется в качестве противомикробного препарата и добавляется в различные косметические средства. Его крайне слабая токсичность по отношению к клеткам животных связана с его слабым действием на мембрану митохондрий. Структура триклозана предполагает, что он представляет собой обычный анионный разобщитель фенольного ряда с $pK_a = 7.9$ [42].

Как упоминалось выше, отклонения от P-vs-U-корреляции традиционно объясняют взаимодействием разобщителей с белками внутренней мембраны митохондрий, которые могут приводить к усилению переноса ионов водорода в результате ускорения переноса анионной формы протонофора через липидную часть мембраны [17, 35]. Эту концепцию хорошо иллюстрирует индукция протонной проводимости в мембране митохондрий жирными кислотами, которая значительно подавляется при добавлении карбоксиатрактилозида (Катр), специфического ингибитора транслокатора адениновых нуклеотидов в митохондриях [16, 31]. Предполагается, что анионы жирных кислот способны взаимодействовать с местом посадки АТФ и/или АДФ и таким образом переноситься через мем-

брану. Высокая проницаемость липидной мембраны для протонированной формы жирных кислот [43] позволяет им осуществлять цикл переноса протона. Помимо жирных кислот, Катр, хотя и в меньшей степени, ингибирует разобщающее действие DNP на митохондриях [16, 44]. Эти данные позволяют предположить, что анион DNP тоже может взаимодействовать с местом связывания жирных кислот на АДФ/АТФ-транслокаторе. Недавно показали, что взаимодействие DNP с выделенным и реконструированным транслокатором блокируется при замене аргинина 79 на серин в этом белке [44].

Собственно активное взаимодействие разобщителей с протонными помпами было известно еще до работ конца 60-х - начала 70-х годов, поскольку у всех известных на тот момент разобщителей обнаруживалась колоколообразная зависимость скорости дыхания митохондрий или субмитохондриальных частиц (СМЧ) от их концентрации, т.е. вслед за стимуляцией дыхания при низких концентрациях всегда наблюдалось его ингибирование при больших концентрациях разобщителей [45, 46]. Это явление касается субстратов всех основных дыхательных комплексов митохондрий. В дальнейшем были уточнены сайты и характер этого взаимодействия. Так, в случае первого комплекса это взаимодействие хорошо коррелирует с гидрофобностью соединений, что было объяснено существованием гидрофобной площадки в белке, служащей местом связывания убихинона [47]. В случае сукцинатдегидрогеназы наиболее активным местом связывания разобщителей является терминальный участок цепи, при этом сродство, скажем, к пентахлорфенолу здесь может достигать 2 мкМ [48]. Показано также, что цитохромоксидаза имеет сайт связывания СССР [49], при взаимодействии с которым резко меняется сродство белка к кислороду [50]. Интересно, что метилирование протонируемой группы в разобщителях подавляет не только их разобщающее, но и ингибирующее действие [45, 51]. Этот важный факт до сих пор не нашел своего объяснения, он указывает на тесную связь ингибирующего действия с механизмом собственно разобщения. Следует сказать, однако, что некоторые разобщители характеризуются необычно широким колоколом по концентрации [22, 52].

В рамках такой концепции отклонение триклозана от P-vs-U-корреляции в другую сторону, по сравнению с жирными кислотами, обусловлено тем, что основная часть протонофоров использует те или иные белки при индукции протонной проводимости на мембранах митохондрий. Поскольку триклозан индуцирует ток БЛМ большей величины, чем СССР, и при этом на митохондриях он не рабо-

тает в тех концентрациях, при которых работает СССР, то следует предположить, что и СССР индуцирует ток протонов на митохондриях через какой-то белок. В пользу такого предположения говорят прямые опыты по взаимодействию азидо-производного СССР с белками митохондрий [15]. В недавней работе нашей лаборатории показано, что трифенилфосфониевый конъюгат СССР, который сам не разобщает митохондрии, способен блокировать разобщающее действие СССР [53]. В пользу участия белка в разобщающей активности СССР свидетельствует также сильное ингибирование действия СССР на митохондриях под влиянием 6-кетохлестанола, который способен, напротив, усиливать вызванный СССР протонный ток на БЛМ в силу увеличения дипольного потенциала мембран [54]. Таким образом, мы приходим к выводу, что в случае имеющихся традиционных разобщителей P-vs-U-корреляция не связана с тем, что разобщители окислительного фосфорилирования являются протонофорами как таковыми (т.е. переносчиками протонов через липидную часть мембраны митохондрий). По-видимому, это обусловлено силой взаимодействия большинства этих веществ с некоторым белком (белками) митохондрий.

Следует также упомянуть, что P-vs-U-корреляция явно нарушается в ряду гомологов некоторых разобщителей. Так, в нашей лаборатории показано, что как на плоских БЛМ, так и в липосомах протонофорная активность разобщителей на основе популярного флуоресцентного красителя 7-нитробенз-2-окса-1,3-диазола (NBD), имеющих алкильный заместитель, увеличивается по мере роста длины алкильной цепи [55]. В митохондриях же разобщающая активность достигает максимума в случае октильного заместителя, и децильное производное разобщает митохондрии существенно слабее октильного [55]. Аналогичным образом в ряду алкилродаминов (CnR1) наблюдается возрастание протонофорной активности в липосомах [56] и на БЛМ с ростом длины алкильной цепи, в то время как максимальное разобщение в митохондриях вызывает C4R1 [21]. Наличие оптимальной длины алкильной цепи также говорит о возможном участии сайтов связывания на белках митохондрий при индукции протонной утечки. В этой связи уместно упомянуть, что разобщение жирными кислотами также имеет оптимум по длине жирной кислоты, где в случае насыщенных жирных кислот максимальное разобщение вызывает пальмитиновая кислота, а более длинные кислоты работают слабее [57]. В недавней работе из лаборатории Самарцева показано, что α,ω -гексадецилдикарбоновая кислота стимулирует дыхание митохондрий, не вызывая

при этом индукции протонной проводимости мембраны митохондрий [58]. Этот новый феномен еще требует своего изучения и осмысления.

Таким образом, на современном этапе можно сделать вывод о достаточно плохой P-vs-U-корреляции, построенной с использованием большого количества новых разобщителей, открытых и изученных с момента появления первых работ в этой области. Однако нужно подчеркнуть, что сама теория Митчелла, во многом принятая научным сообществом благодаря P-vs-U-корреляции, не может подвергаться сомнению на данном основании. Дело в том, что теория Митчелла доказана многими прямыми экспериментами, такими, как измерение генерации электрических потенциалов протонными помпами [59] или обнаружение синтеза АТФ в системе липосом с реконструированным бактериородопсином и АТФ-синтазой [60]. Кроме того, нет сомнений, что разобщающее действие каналоформера грамицидина А осуществляется через образование протонного канала и индукции протонной утечки во внутренней мембране митохондрий. Согласно теории Митчелла, важна не P-vs-U-корреляция, а корреляция между разобщением митохондрий (т.е. стимуляцией дыхания и гидролиза АТФ) и протонофорной активностью разобщителей, измеренной непосредственно на митохондриях [61]. Для теории Митчелла неважно, индуцирует ли разобщитель ток протонов на митохондриальной мембране сам по себе через липидные части мембраны, или он делает это с помощью какого-то митохондриального белка. Утечку протонов в митохондриальной мембране можно измерять в деэнергизованных условиях по набуханию митохондрий в среде с ацетатом калия в присутствии валиномицина или с нитратом аммония без валиномицина [26]. Этим методом показано, что жирные кислоты индуцируют протонную проводимость внутренней митохондриальной мембраны в тех же концентрациях, при которых они стимулируют дыхание митохондрий [26]. Таким образом, несмотря на то, что жирные кислоты выпадают из P-vs-U-корреляции, индукция ими протонной проводимости на митохондриях только подтверждает силу теории Митчелла.

Отдельный вопрос – есть ли «честный» протонофор, который работает на митохондриях без участия белков? Как описано выше, вряд ли такими протонофорами можно считать наиболее популярные разобщители DNP и СССР. На такую роль может претендовать грамицидин А, однако помимо протона он транспортирует ионы калия и натрия, что делает его очень токсичным для клеток. Возможно, на такую роль может претендовать триклозан, который является чрезвычайно актив-

ным протонифором на БЛМ, превосходя как СССР, так и SF6847 – самый мощный из известных разобщителей [40]. Однако триклозан вызывает стимуляцию дыхания митохондрий и их набухание в среде с ацетатом калия (в присутствии валиномицина) лишь в концентрации 3–10 мкМ. В результате триклозан сильно выпадает из P-vs-U-корреляции (рис. 2, красная стрелка слева). Согласно [40], причиной этого отклонения от P-vs-U-корреляции может быть высокая гидрофобность триклозана, которая мешает ему преодолевать внешнюю мембрану митохондрий. Возможно, однако, что даже эта слабая разобщающая активность все же обусловлена взаимодействием триклозана с каким-то белком. В этой связи следует упомянуть, что триклозан взаимодействует с NADH-дегидрогеназой митохондрий и ингибирует ее при более высоких концентрациях (30–100 мкМ) [41].

ПРОТОНОФОРЫ И ПРОТОННЫЕ ПМПЫ

Выше уже рассмотрен механизм взаимодействия DNP с ATP/ADP-транслокатером, который, как показано, вносит вклад в разобщающее действие DNP на митохондриях [44]. Отметим, что согласно нашим данным транслокатор участвует и в разобщающем действии нового популярного разобщителя BAM15 [62]. Однако нам представляется, что существует и универсальный механизм взаимодействия разобщителей с митохондриями. И этот универсальный механизм отличается от прямого переноса протона через липидную часть мембраны. Можно предложить следующий механизм действия разобщителей, который, с одной стороны, включает способность к переносу протонов через липидную часть мембраны, а с другой, в явном виде требует их взаимодействия с протонными помпами. Этот механизм можно образно охарактеризовать как захват («подворовывание») протонов из каналов протонных помп (нижняя схема на рис. 3). Как известно, все протонные помпы имеют протонные каналы, которые выстланы соответствующими аминокислотами, чтобы оградить протон от утечки в водную фазу. Но природе не требовалось ограждать протонные пути от утечки в липидную фазу, поскольку гидратированный протон очень гидрофилен и существует огромный энергетический барьер для его перехода в липидную фазу. Поэтому можно предположить, что некоторые каналы протонных помп (а может быть, и большинство таких каналов) не имеют полной изоляции от утечки протонов в гидрофобном слое мембраны. Поскольку протонифоры – это липофильные кислоты, то они могут перехватывать протоны, которые откачиваются из матрикса митохондрий при переносе электронов по дыхательной

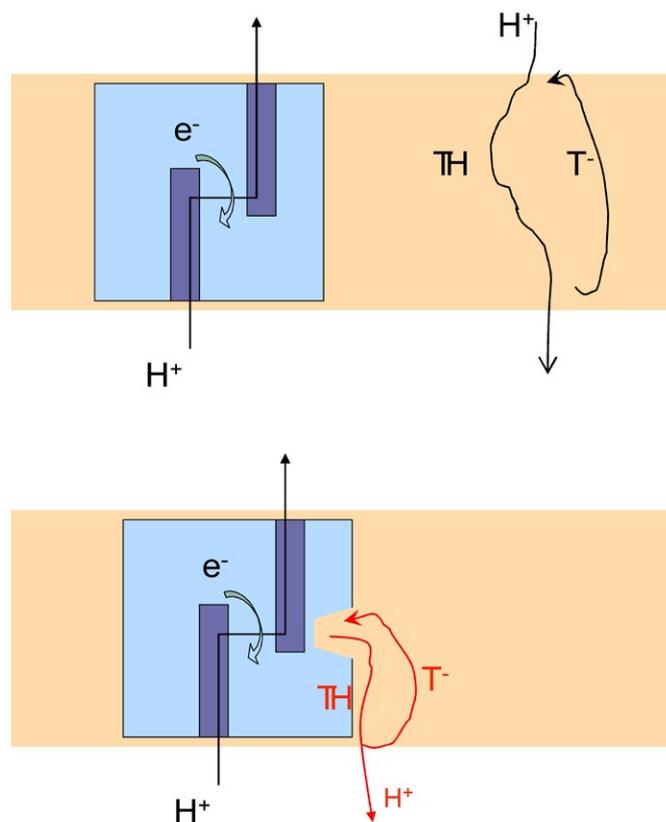


Рис. 3. Схема классического протонифорного действия анионного разобщителя Т (схема сверху) и варианта разобщающего действия, связанного с прямым взаимодействием Т с протонным каналом протонной помпы (нижняя схема). Протонифор Т переносит протоны в виде протонированного комплекса ТН и возвращается через цикл депротонирования до аниона Т

цепи, и возвращать их в матрикс еще до их попадания в межмембранное пространство. Тем самым вызывается abortивный цикл протонов, аналогичный классическому разобщению. Такое представление смыкается с ранее предложенным механизмом протонных утечек (slips) при работе протонных помп [63], который обсуждался в связи с нарушениями целостности мембраны при добавлении органических растворителей и других грубых воздействиях. Кроме того, подобное представление делает понятным подавление работы протонных помп при высоких концентрациях разобщителей, поскольку взаимодействие с протонным каналом митохондриальной помпы при повышении концентрации может приводить к полному блокированию этого канала, тем самым вызывая ингибирование работы фермента. Поскольку структуры большинства протонных помп митохондрий к настоящему моменту уже установлены, гипотезу о механизме разобщения митохондрий можно проверить с помощью анализа

методами биоинформатики. Дальнейшая работа покажет обоснованность этой гипотезы.

ПРОТОНОФОРЫ И МЯГКОЕ РАЗОБЩЕНИЕ

Несмотря на то что сам термин протонофор определен достаточно ясно (протонофор способен электрогенно переносить катион водорода через гидрофобную фазу), употребление этого термина в контексте митохондрий на практике сталкивается с определенными сложностями при его сочетании с термином разобщитель (*uncoupler*). Например, называть ли индукцию утечек под действием детергентов [64–66] или органических растворителей [63] протонофорным действием? Формально в этом случае индуцируется также утечка по протону, но поскольку появляются утечки и по другим ионам, то называть это протонофорным эффектом вряд ли оправдано. Более сложен вопрос о том, являются ли протонофорами такие проникающие органические катионы, накапливающиеся в митохондриях, как *mitoQ* и *SkQ*. Показано, что эти катионы способны транспортировать анионы жирных кислот через мембраны и служить индукторами протонной проводимости мембран в присутствии жирных кислот, которые обычно содержатся в клетках [67]. Уже опубликованы статьи, в которых термин протонофор применяется к *mitoQ* [25] и *SkQ* [68]. Однако эти катионы не способны транспортировать ионы водорода через мембраны, поэтому нам кажется, что применение к ним термина протонофор недостаточно оправдано. С другой стороны, наверное, есть определенные основания называть их разобщителями.

Другое достаточно противоречивое понятие, связанное с применением разобщителей, – термин «мягкое разобщение». Этот термин предложен Скулачевым [17] и Старковым [69] для обозначения состояния митохондрий, которое характеризуется сниженным уровнем мембранного потенциала, сниженным уровнем генерации активных форм кислорода (АФК), небольшой стимуляцией дыхания и сохраняющейся высокой активностью АТФ-синтазы. Такое состояние может вызываться механизмами, присущими самим митохондриям (разобщением эндогенными жирными кислотами или функционированием белков семейства *UCP*), или добавлением небольшой концентрации разобщителей. Термин мягкое разобщение введен в связи с обнаруженной нелинейной зависимостью генерации АФК от мембранного потенциала митохондрий [70]. Хотя само понятие мягкого разобщения не было количественно определено, оно может считаться оправданным в связи с многочисленными примерами терапевтического действия низких концентраций разобщите-

лей в физиологических моделях различных патологических состояний [71]. Мы остановимся более подробно на этом вопросе при обсуждении терапевтического действия разобщителей.

ПРИКЛАДНОЕ ЗНАЧЕНИЕ ПРОТОНОФОРОВ

История изучения протонофоров насчитывает уже более 50 лет. В заключение нашего краткого обзора хотелось бы остановиться на практическом применении протонофоров. Начать тут следует с истории DNP, который в 30-х годах прошлого века активно применяли в качестве средства от ожирения [72]. Этот препарат отпускался без рецепта и его использовали более 100000 человек, но в 1938 году он был запрещен из-за выявленных побочных эффектов, связанных с гепатотоксичностью и проблемами со зрением. Интересно, что сейчас вновь вырос интерес к DNP [73] в связи с появлением более сложных форм DNP в виде простого этилового эфира [74], которые превращаются в DNP преимущественно в печени, либо в виде комплексов DNP с наночастицами [75]. Эти препараты проявляли сильное антидиабетическое действие на крысах, а также были эффективны при неалкогольной жировой болезни печени. Более успешна клиническая судьба протонофоров, которые используются в качестве антигельминтных препаратов. Речь идет о салициланилидах, таких, как никлозамид. Механизм действия этих препаратов определен именно как разобщение окислительного фосфорилирования в клетках червей [76, 77]. При этом они слабо воздействуют на организм человека, поскольку плохо всасываются в желудочно-кишечном тракте. Давно установлено, что многие протонофоры обладают и противомикробным действием [78]. Однако их общая токсичность препятствовала их использованию в качестве антибиотиков. Тем не менее, такие сильные протонофоры, как триклозан, усниновая кислота [51], никлозамид [79] и пирроломидин [80] проявляют лишь умеренное токсическое действие на эукариотические клетки при очень сильном антимикробном эффекте. Некоторые противотуберкулезные препараты также обладают протонофорным действием [81–83]; противотуберкулезным действием обладает и усниновая кислота, т.е. в целом можно сказать, что протонофоры сохраняют актуальность для фармакологии, а в некоторых областях их потенциал даже растет.

Можно упомянуть также широко используемое инсектицидное, гербицидное (пестицидное) и фунгицидное действие протонофоров, аналогов динитрофенола, таких, как пентахлорфенол [84] и 6-изобутил-2,4-динитрофенол (диносеб) [85], а также флуазинам [86, 87] и другие соединения. Речь идет о достаточно большом производстве и рын-

ке для сельского хозяйства и лесной промышленности (как консервантов дерева). Однако в рамках нашего обзора нам ближе не промышленное применение протонофоров, а их потенциальное значение для фармакологии. За долгую историю изучения протонофоров накопилось много данных, полученных на моделях патологий животных, об их протекторных свойствах: они являются кардиопротекторами [88], нейропротекторами [73, 89], нефропротекторами [90], радиопротекторами [91], обладают антидиабетическим действием [75, 92, 93], и этот список можно продолжить. Отмечают потенциал разобщителей как противоопухолевых препаратов [94]. Более того, низкие дозы DNP достоверно увеличивают продолжительность жизни крыс [95], дрожжей [96] и дрозофил [97]. Как упоминалось выше, такое протекторное действие обусловлено способностью разобщителей подавлять образование АФК в митохондриях, которое во многом определяется величиной мембранного потенциала [98]. Современные работы говорят о том, что снижение мембранного потенциала митохондрий в клетках под действием низких концентраций разобщителей способно запускать целый каскад изменений метаболизма клеток, что может приводить к таким последствиям, как увеличение митохондриальной массы в некото-

рых клетках [99, 100], активация митофагии [101], изменение соотношения гликолиза и окислительного фосфорилирования [102] и многим другим [89, 103]. На важную роль кальция и сАМР в перестройке метаболизма клеток указывают результаты многих работ [73, 100–103]. Gao и соавт. предлагают называть мягким разобщением такое состояние, при котором используемая доза разобщителя не приводит к снижению пролиферативного потенциала клеток, но заметно влияет на некоторые регуляторные каскады, такие, как STAT3 [104].

Таким образом, детальное изучение механизма действия протонофоров на митохондрии остается важной задачей, решение которой, вполне возможно, позволит перейти от опытов на животных к использованию препаратов на основе протонофоров в клинической практике не только как антигельминтных средств, но и в качестве лекарств, эффективных при различных распространенных и тяжелых заболеваниях. ●

Работа поддержана грантом РНФ № 21-14-00062.

Мы благодарны академику В.П. Скулачеву и профессору Л.С. Ягужинскому за плодотворное обсуждение некоторых аспектов данного обзора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Skulachev V.P. // FEBS Lett. 1970. V. 11. № 5. P. 301–308.
- Bielawski J., Thompson T.E., Lehninger A.L. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1966. V. 24. № 6. P. 948–954.
- Skulachev V.P., Sharaf A.A., Liberman E.A. // Nature. 1967. V. 216. № 5116. P. 718–719.
- Liberman E.A., Topali V.P. // Biochim. Biophys. Acta. 1968. V. 163. № 2. P. 125–136.
- Mitchell P. // Biol. Rev. 1966. V. 41. № 3. P. 445–502.
- Mitchell P., Moyle J. // Biochem. J. 1967. V. 104. № 2. P. 588–600.
- Chappell J.B., Haarhoff K.N. // Biochemistry of mitochondria / Eds Slater E.C., Kaniuga Z., Wojtczak L. New York: Academic Press, 1967. P. 75–91.
- Liberman E.A., Topaly V.P., Tsofina L.M., Jasaitis A.A., Skulachev V.P. // Nature. 1969. V. 222. № 5198. P. 1076–1078.
- Pressman B.C. // Federation Proc. 1968. V. 27. № 6. P. 1283–1288.
- Ovchinnikov Y.A., Ivanov V.T., Shkrob A.M. Membrane-active complexones. Amsterdam, New York: Elsevier, 1974.
- Ting H.P., Wilson D.F., Chance B. // Arch. Biochem. Biophys. 1970. V. 141. № 1. P. 141–146.
- Bakker E.P., van den Heuvel E.J., Wiechmann A.H., van Dam K. // Biochim. Biophys. Acta. 1973. V. 292. № 1. P. 78–87.
- McLaughlin S., Dilger J.P. // Physiol. Rev. 1980. V. 60. № 3. P. 825–863.
- Hatefi Y. // J. Supramol. Struct. 1975. V. 3. № 3. P. 201–213.
- Katre N.V., Wilson D.F. // Arch. Biochem. Biophys. 1978. V. 191. № 2. P. 647–656.
- Andreyev A.Y., Bondareva T.O., Dedukhova V.I., Mokhova E.N., Skulachev V.P., Volkov N.I. // FEBS Lett. 1988. V. 226. № 2. P. 265–269.
- Skulachev V.P. // Biochim. Biophys. Acta. 1998. V. 1363. № 2. P. 100–124.
- Liberman E.A., Topaly V.P., Silberstein A.Y. // Biochim. Biophys. Acta. 1970. V. 196. № 2. P. 221–234.
- Schwaller M.A., Allard B., Lescot E., Moreau F. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. № 39. P. 22709–22713.
- Gear A.R. // J. Biol. Chem. 1974. V. 249. № 11. P. 3628–3637.
- Khailova L.S., Silachev D.N., Rokitskaya T.I., Avetisyan A.V., Lyamzaev K.G., Severina I.I., Il'yasova T.M., Gulyaev M.V., Dedukhova V.I., Trendeleva T.A., et al. // Biochim. Biophys. Acta-Bioenergetics. 2014. V. 1837. № 10. P. 1739–1747.
- Denisov S.S., Kotova E.A., Plotnikov E.Y., Tikhonov A.A., Zorov D.B., Korshunova G.A., Antonenko Y.N. // Chem. Commun. 2014. V. 50. № 97. P. 15366–15369.
- Rokitskaya T.I., Terekhova N.V., Khailova L.S., Kotova E.A., Plotnikov E.Y., Zorov D.B., Tatarinov D.A., Antonenko Y.N. // Bioconjug. Chem. 2019. V. 30. № 9. P. 2435–2443.
- Terekhova N.V., Khailova L.S., Rokitskaya T.I., Nazarov P.A., Islamov D.R., Usachev K.S., Tatarinov D.A., Mironov V.F., Kotova E.A., Antonenko Y.N. // ACS Omega. 2021. V. 6. № 31. P. 20676–20685.
- Childress E.S., Alexopoulos S.J., Hoehn K.L., Santos W.L. // J. Med. Chem. 2018. V. 61. № 11. P. 4641–4655.
- Schonfeld P., Wieckowski M.R., Wojtczak L. // FEBS Lett. 2000. V. 471. № 1. P. 108–112.
- Andreyev A.Y., Bondareva T.O., Dedukhova V.I., Mokhova E.N., Skulachev V.P., Tsofina L.M., Volkov N.I., Vygodina T.V.

- // Eur. J. Biochem. 1989. V. 182. № 3. P. 585–592.
28. Rupprecht A., Sokolenko E.A., Beck V., Ninnemann O., Jaburek M., Trimbuch T., Klisshin S.S., Jezek P., Skulachev V.P., Pohl E.E. // *Biophys. J.* 2010. V. 98. № 8. P. 1503–1511.
29. Montal M., Mueller P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1972. V. 69. № 12. P. 3561–3566.
30. Wojtczak L., Schonfeld P. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1993. V. 1183. № 1. P. 41–57.
31. Bertholet A.M., Chouchani E.T., Kazak L., Angelin A., Fedorenko A., Long J.Z., Vidoni S., Garriti R., Cho J., Terada N., et al. // *Nature.* 2019. V. 571. № 7766. P. 515–520.
32. Kreiter J., Rupprecht A., Skulj S., Brkljako Z., Zuna K., Knyazev D.G., Bardakji S., Vazdar M., Pohl E. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 5. P. 2490.
33. Samartsev V.N., Smirnov A.V., Zeldi I.P., Markova O.V., Mokhova E.N., Skulachev V.P. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1997. V. 1319. № 2–3. P. 251–257.
34. Whitehouse M.W., Dean P.D. // *Biochem. Pharmacol.* 1965. V. 14. P. 557–567.
35. Lou P.H., Hansen B.S., Olsen P.H., Tullin S., Murphy M.P., Brand M.D. // *Biochem. J.* 2007. V. 407. № 1. P. 129–140.
36. Brockman H. // *Chem. Phys. Lipids.* 1994. V. 73. P. 57–79.
37. Liberman E.A., Topaly V.P. // *Biophysics (Moscow).* 1969. V. 14. P. 477–487.
38. Pickar A.D., Benz R. // *J. Membrane Biol.* 1978. V. 44. P. 353–376.
39. Gawrisch K., Ruston D., Zimmerberg J., Parsegian V.A., Rand R.P., Fuller N. // *Biophys. J.* 1998. V. 61. № 5. P. 1213–1223.
40. Popova L.B., Nosikova E.S., Kotova E.A., Tarasova E.O., Nazarov P.A., Khailova L.S., Balezina O.P., Antonenko Y.N. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2018. V. 1860. № 5. P. 1000–1007.
41. Teplova V.V., Belosludtsev K.N., Kruglov A.G. // *Toxicol. Lett.* 2017. V. 275. P. 108–117.
42. Pemberton R.M., Hart J.P. // *Analit. Chim. Acta.* 1999. V. 390. № 1–3. P. 107–115.
43. Kamp F., Hamilton J.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992. V. 89. № 23. P. 11367–11370.
44. Zuna K., Jovanovic O., Khailova L.S., Skulj S., Brkljako Z., Kreiter J., Kotova E.A., Vazdar M., Antonenko Y.N., Pohl E. // *Biomolecules.* 2021. V. 11. № 8. P. 1178.
45. Skulachev V.P., Sharaf A.A., Yaguzhinsky L.S., Jasaitis A.A., Liberman E.A., Topali V.P. // *Curr. Mod. Biol.* 1968. V. 2. № 2. P. 98–105.
46. Wilson D.F., Merz R. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1969. V. 129. № 1. P. 79–85.
47. Yaguzhinsky L.S., Smirnova E.G., Ratnikova L.A., Kolesova G.M., Krasinskaya I.P. // *J. Bioenerg. Biomembr.* 1973. V. 5. № 1. P. 163–174.
48. Afanas'eva E.V., Kostyrko V.A. // *Biochimie.* 1986. V. 51. № 5. P. 823–829.
49. Bona M., Antalík M., Gazova Z., Kuchar A., Davak V., Podhradský D. // *Gen. Physiol. Biophys.* 1993. V. 12. № 6. P. 533–542.
50. Wilson D.F., Rumsey W.L., Green T.J., Vanderkooi J.M. // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. № 6. P. 2712–2718.
51. Antonenko Y.N., Khailova L.S., Rokitskaya T.I., Nosikova E.S., Nazarov P.A., Luzina O.A., Salakhutdinov N.F., Kotova E.A. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2019. V. 1860. № 4. P. 310–316.
52. Kenwood B.M., Weaver J.L., Bajwa A., Poon I.K., Byrnie F.L., Murrow B.A., Calderone J.A., Huang L., Divakaruni A.S., Tomsig J.L., et al. // *Mol. Metab.* 2014. V. 3. № 2. P. 114–123.
53. Iaubasarova I.R., Khailova L.S., Firsov A.M., Grivennikova V.G., Kirsanov R.S., Korshunova G.A., Kotova E.A., Antonenko Y.N. // *PLoS One.* 2020. V. 15. № 12. P. e0244499.
54. Starkov A.A., Bloch D.A., Chernyak B.V., Dedukhova V.I., Mansurova S.E., Severina I.I., Simonyan R.A., Vygodina T.V., Skulachev V.P. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1997. V. 1318. № 1–2. P. 159–172.
55. Denisov S.S., Kotova E.A., Khailova L.S., Korshunova G.A., Antonenko Y.N. // *Bioelectrochemistry.* 2014. V. 98. P. 30–38.
56. Antonenko Y.N., Avetisyan A.V., Cherepanov D.A., Knorre D.A., Korshunova G.A., Markova O.V., Ojovan S.M., Perevoshchikova I.V., Pustovidko A.V., Rokitskaya T.I., et al. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. № 20. P. 17831–17840.
57. Samartsev V.N., Rybakova S.R., Dubinin M.V. // *Biofizika.* 2013. V. 58. № 3. P. 481–487.
58. Semenova A.A., Samartsev V.N., Dubinin M.V. // *Biochimie.* 2021. V. 181. P. 215–225.
59. Drachev L.A., Jasaitis A.A., Kaulen A.D., Kondrashin A.A., Liberman E.A., Nemecek I.B., Ostroumov S.A., Semenov A.Y., Skulachev V.P. // *J. Biol. Chem.* 1974. V. 249. № 455. P. 321–324.
60. Winget G.D., Kanner N., Racker E. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1977. V. 460. № 3. P. 490–499.
61. Cunarro J., Weiner M.W. // *Nature.* 1973. V. 245. P. 36–37.
62. Firsov A.M., Popova L.B., Khailova L.S., Nazarov P.A., Kotova E.A., Antonenko Y.N. // *Bioelectrochemistry.* 2021. V. 137. P. 107673.
63. Luvisetto S., Pietrobon D., Azzone G.F. // *Biochemistry.* 1987. V. 26. № 23. P. 7332–7338.
64. Carafoli E., Rossi C.S., Gazzotti P. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1969. V. 131. № 2. P. 527–537.
65. Brustovetsky N.N., Dedukhova V.I., Egorova M.V., Mokhova E.N., Skulachev V.P. // *FEBS Lett.* 1990. V. 272. № 1–2. P. 187–189.
66. Bragadin M., Dell'Antone P. // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 1996. V. 30. № 2. P. 280–284.
67. Severin F.F., Severina I.I., Antonenko Y.N., Rokitskaya T.I., Cherepanov D.A., Mokhova E.N., Vyssokikh M.Y., Pustovidko A.V., Markova O.V., Yaguzhinsky L.S., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. № 2. P. 663–668.
68. Lyamzaev K.G., Tokarchuk A.V., Panteleeva A.A., Mulikdjanian A.Y., Skulachev V.P., Chernyak B.V. // *Autophagy.* 2018. V. 14. № 5. P. 921–924.
69. Starkov A.A. // *Biosci. Rep.* 1997. V. 17. № 3. P. 273–279.
70. Korshunov S.S., Skulachev V.P., Starkov A.A. // *FEBS Lett.* 1997. V. 416. № 1. P. 15–18.
71. Caldeira da Silva C.C., Cerqueira F.M., Barbosa L.F., Medeiros M.H., Kowaltowski A.J. // *Aging Cell.* 2008. V. 7. № 4. P. 552–560.
72. Colman E. // *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2007. V. 48. № 2. P. 115–117.
73. Geisler J.G. // *Cells.* 2019. V. 8. № 3. P. 280.
74. Perry R.J., Kim T., Zhang X.M., Lee H.Y., Pesta D., Popov V.B., Zhang D.Y., Rahimi Y., Jurczak M.J., Cline G.W., et al. // *Cell Metabolism.* 2013. V. 18. № 5. P. 740–748.
75. Perry R.J., Zhang D.Y., Zhang X.M., Boyer J.L., Shulman G.I. // *Science.* 2015. V. 347. № 6227. P. 1253–1256.
76. Kadri H., Lambourne O.A., Mehellou Y. // *ChemMedChem.* 2018. V. 13. № 11. P. 1088–1091.
77. Кожокару А.Ф. // *Международный журн. прикладных и фундаментальных исследований.* 2019. V. 10. № 1. P. 11–22.
78. Lewis K., Naroditskaya V., Ferrante A., Fokina I. // *J. Bioenerg. Biomembr.* 1994. V. 26. № 6. P. 639–646.
79. Tharmalingam N., Port J., Castillo D., Mylonakis E. // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. № 1. P. 3701.
80. Valderrama K., Pradel E., Firsov A.M., Drobecq H., Baud-

- erlique-le Roy H., Villemagne B., Antonenko Y.N., Hartkoorn R.C. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2019. V. 63. № 10. e01450-19.
81. Hards K., McMillan D.G., Schurig-Briccio L.A., Gennis R., Lill H., Bald D., Cook G.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2018. V. 115. № 28. P. 7326–7331.
82. Garcia-Garcia V., Oldfield E., Benaim G. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016. V. 60. № 10. P. 6386–6389.
83. Feng X., Zhu W., Schurig-Briccio L.A., Lindert S., Shoen C., Hitchings R., Li J., Wang Y., Baig N., Zhou T., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015. V. 112. № 51. P. E7073–E7082.
84. Pentachlorophenol: Chemistry, pharmacology, and environmental toxicology. New York: Plenum Press, 1978.
85. Palmeira C.M., Moreno A.J., Madeira V.M. // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1994. V. 127. № 1. P. 50–57.
86. Hollingworth R.M., Gadelhak G.G. // *Rev. Toxicol.* 1998. V. 2. № 2. P. 253–266.
87. Clarke E.D., Greenhow D.T., Adams D. // *Pesticide Sci.* 1998. V. 54. № 4. P. 385–393.
88. Cadenas S. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2018. V. 1859. № 9. P. 940–950.
89. Zorov D.B., Andrianova N.V., Babenko V.A., Pevzner I.B., Popkov V.A., Zorov S.D., Zorova L.D., Plotnikov E.Y., Sukhikh G.T., Silachev D.N. // *Brain Sci.* 2021. V. 11. № 8. P. 1050.
90. Plotnikov E.Y., Silachev D.N., Jankauskas S.S., Rokitskaya T.I., Chupyrkina A.A., Pevzner I.B., Zorova L.D., Isaev N.K., Antonenko Y.N., Skulachev V.P., Zorov D.B. // *Biochemistry (Moscow).* 2012. V. 7. № 9. P. 1029–1037.
91. Rai Y., Anita A., Kumari N., Singh S., Kalra N., Soni R., Bhatt A.N. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2021. V. 1862. № 1. P. 148325.
92. Tao H.L., Zhang Y., Zeng X.G., Shulman G.I., Jin S.K. // *Nature Medicine.* 2014. V. 20. № 11. P. 1263–1269.
93. Kanemoto N., Okamoto T., Tanabe K., Shimada T., Minoshima H., Hidoh Y., Aoyama M., Ban T., Kobayashi Y., Ando H., et al. // *Nat. Comm.* 2019. V. 10. № 1. P. 2172.
94. Shrestha R., Johnson E., Byrne F.L. // *Mol. Metab.* 2021. V. 51. P. 101222.
95. Tainter M.L. // *J. Pharm. Exp. Ther.* 1938. V. 63. P. 51–57.
96. Barros M.H., Bandy B., Tahara E.B., Kowaltowski A.J. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 48. P. 49883–49888.
97. Padalko V.I. // *Biochemistry (Moscow).* 2005. V. 70. № 9. P. 986–989.
98. Zorov D.B., Juhascova M., Sollott S.J. // *Physiol. Rev.* 2014. V. 94. № 3. P. 909–950.
99. Cerqueira F.M., Laurindo F.R., Kowaltowski A.J. // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 3. P. e18433.
100. Schlagowski A.I., Singh F., Charles A.L., Ramamoorthy T.G., Favret F., Piquard F., Geny B., Zoll J. // *J. Appl. Physiol.* 2014. V. 116. № 4. P. 364–375.
101. Berezhnov A.V., Soutar M.P., Fedotova E., Frolova M.S., Plun-Favreau H., Zinchenko V.P., Abramov A.Y. // *J. Biol. Chem.* 2016. V. 291. № 16. P. 8701–8708.
102. Shulman G.I., Petersen M.C., Vatner D.F. // *Nat. Rev. Endocrinol.* 2017. V. 13. № 10. P. 572–587.
103. Zorova L.D., Popkov V.A., Plotnikov E.Y., Silachev D.N., Pevzner I.B., Jankauskas S.S., Babenko V.A., Zorov S.D., Balakireva A.V., Juhascova M., et al. // *Anal. Biochem.* 2018. V. 552. P. 50–59.
104. Gao J.L., Zhao J., Zhu H.B., Peng X., Zhu J.X., Ma M.H., Fu Y., Hu N., Tai Y., Xuan X.C., et al. // *Free Radic. Biol. Med.* 2018. V. 124. P. 288–298.

УДК 577.22

Биогенез эукариотических рибосом: 40S субъединица

А. А. Моралева¹, А. С. Дерябин^{1*}, Ю. П. Рубцов¹, М. П. Рубцова^{1,2*}, О. А. Донцова^{1,2,3}¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия³Сколковский институт наук и технологий, Москва, 121205 Россия

*E-mail: deryabin95@mail.ru, mprubtsova@gmail.com

Поступила в редакцию 29.07.2021

Принята к печати 11.02.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11540

РЕФЕРАТ Формирование эукариотических рибосом – это последовательное созревание рибосомных предшественников в ядрышке, нуклеоплазме и цитоплазме. Сотни факторов биогенеза рибосом обеспечивают точный процессинг и формирование третичной структуры рибосомных РНК, а также взаимодействие с ними рибосомных белков. Большая часть знаний о сборке рибосом получена в результате изучения клеток дрожжей, и долгое время считали, что механизмы биогенеза рибосом эукариот очень консервативны. Основные стадии биогенеза рибосом сходны в разных группах эукариот, однако у человека этот процесс значительно сложнее из-за большего размера рибосом и пре-рибосом, а также возникновения регуляторных путей, влияющих на их сборку и функцию. Множество факторов, необходимых для биогенеза именно рибосом человека, выявлено с помощью полногеномных скринингов на основе РНК-интерференции. В данном обзоре на примере 40S субъединицы рассмотрены ключевые аспекты биогенеза рибосом у дрожжей и человека. Механизмы, лежащие в основе этих различий, недостаточно изучены, потому что не существует эффективных методов характеристики пре-рибосомных комплексов человека. Мутации в генах, кодирующих рибосомные белки и факторы биогенеза рибосом, приводят к генетическим заболеваниям (рибосомопатиям), сборка рибосом регулируется онкогенными сигнальными путями, а дефекты биогенеза рибосом связаны с активацией опухолевых супрессоров, что делает задачу понимания механизмов биогенеза рибосом актуальной.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ядрышко, биогенез рибосом, рибосомопатии.

ВВЕДЕНИЕ

Рибосомы – это молекулярные РНК-белковые машины, обеспечивающие трансляцию генетической информации мРНК в белки. Рибосомы 80S эукариот общей массой 4.3 МДа состоят из двух субъединиц неравного размера (S – константа седиментации). Малая субъединица (40S, или SSU) содержит одну молекулу 18S рРНК и 33 рибосомных белка (RPS, или S). Большая субъединица (60S, или LSU) состоит из трех молекул рРНК (25S/28S, 5.8S и 5S) и, как правило, 47 белков (RPL, или L) [1–4]. Субъединицы содержат несколько функциональных областей, играющих разные роли в процессе трансляции (*рис. 1*); последовательности зрелых рРНК и общая структура рибосом эволюционно консервативны. Синтез рибосом – это фундаментальный для всех форм жизни процесс, и его эффективность определяет пролиферативный и секреторный статус клетки.

В процессе биосинтеза рибосом происходят транскрипция рибосомной ДНК (рДНК) и процес-

синг образующихся предшественников рРНК (пре-рРНК) в зрелые молекулы при участии факторов биогенеза рибосом (ФБР) и рибосомных белков (РБ), а также окончательная сборка всех компонентов в зрелые рибосомы. Только правильное протекание всех этих этапов приводит к формированию функциональных рибосом [5]. Наиболее сложным и интересным процессом является биогенез трех рРНК – 18S, 5.8S и 25S/28S, которые транскрибируются РНК-полимеразой I (Pol I) в виде одного длинного предшественника [6, 7]. Необходимость координации синтеза и процессинга рРНК послужила основанием для формирования специализированной структуры внутри ядра – ядрышка.

ЯДРЫШКО – ФАБРИКА СБОРКИ РИБОСОМ

Хромосомы эукариот обычно занимают определенные территории ядра, в которых гены кластеризованы для оптимального использования аппарата транскрипции [8]. Синтез предшественников рРНК

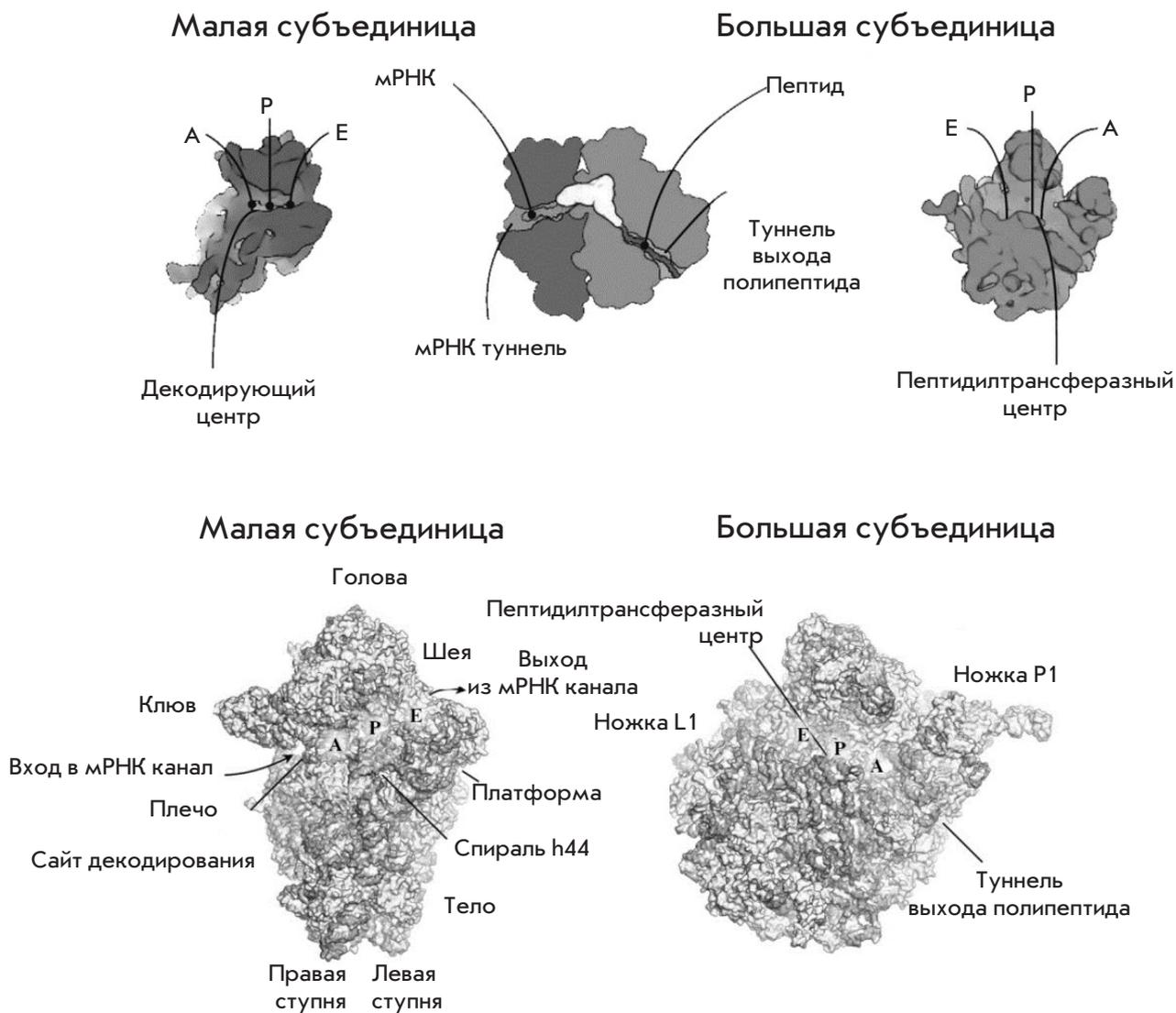


Рис. 1. Пространственное строение субъединиц рибосомы эукариот. На субъединицах подписаны основные функциональные области. В случае малой субъединицы это: (1) канал, в который уложена мРНК во время трансляции; (2) центр декодирования, где происходит спаривание кодона и антикодона, и (3) сайты связывания тРНК (сайты А, Р, Е). Сайт А (аминоацил) – место, занимаемое входящей аминоксил-тРНК, сайт Р (пептидил) – место, в котором находится тРНК с растущей полипептидной цепью (пептидил-тРНК), сайт Е (выход) – место, где происходит диссоциация тРНК от рибосомы. Основные функциональные домены большой субъединицы: (1) сайты связывания тРНК (А, Р и Е); (2) туннель выхода пептида, который простирается над телом субъединицы, и (3) пептидилтрансферазный центр (ПТЦ). ПТЦ отвечает за образование пептидной связи и располагается в начале туннеля выхода пептида, в консервативной области на границе раздела между двумя субъединицами, которая в основном состоит из рРНК. Сворачивание рРНК в третичные структуры и их ассоциация с рибосомными белками генерируют несколько характерных областей в каждой субъединице. В 40S – это Голова, Шея, Платформа, Тело, Левая ступня, Правая ступня, Плечо и Клюв, а также спираль h44 18S рРНК, в основании которой находится центр декодирования. Основные сайты связывания тРНК (А, Р и Е) расположены в интерфейсе (на поверхности). Входной туннель для мРНК расположен между головой и плечом. Выходной канал, место выхода 5'-конца мРНК, расположен между головой и платформой. Центр декодирования расположен на поверхности раздела и включает три домена от головы, плеча и спирали h44 18S рРНК. Основные особенности большой субъединицы – центральный выступ, ножка L1 и ножка P1. Сайты связывания тРНК (А, Р и Е) расположены на стороне интерфейса вместе с ПТЦ. Последний примыкает ко входу в выходной туннель, из которого выходит растущая полипептидная цепь [24]

и ранние этапы сборки рибосом происходят в области ядра, называемой ядрышко. Структурными детерминантами ядрышка являются ядрышковые организаторы (ЯОР) – области/регионы хромосом, в которых сгруппировано множество копий генов рРНК.

Внутригеномное расположение ЯОР зависит от видовой принадлежности организма. У гаплоидных почкующихся дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*) ЯОР локализован на хромосоме 12. У человека ЯОР несут акроцентрические хромосомы 13, 14, 15, 21 и 22 [9–11]. Массивы генов рРНК человека расположены неравномерно на коротких плечах хромосом во вторичных перетяжках между центромерами и теломерами [12, 13]. При делении эукариот ядрышки собираются в конце митоза и остаются функционально активными на протяжении всей интерфазы, распадаясь в начале следующего митоза. Продукция рибосом изменяется в ходе клеточного цикла, достигая максимума в фазе G2 [14]. Морфология ядрышка существенно зависит от условий роста и физиологического статуса клетки [15]. Размер ядрышка коррелирует с пролиферативной активностью клетки; ядрышки быстроделющихся клеток крупнее, чем в клетках с низкой скоростью деления [16]. Объем ядрышка в большинстве опухолевых клеток увеличен по сравнению с клетками, из которых они образовались [17].

Ядрышко – самый крупный отдел ядра, не отделенный мембраной от нуклеоплазмы, его объем составляет 20–25% от объема ядра высших эукариот. По данным электронной микроскопии (ЭМ), более тонкие структуры в составе ядрышка соответствуют основным этапам биогенеза рибосом. Различают фибриллярный центр (ФЦ), плотный фибриллярный компонент (ПФК) и гранулярный компонент (ГК) (рис. 2).

Биогенез рибосом – это векторный процесс, который начинается с синтеза рРНК на границе ФЦ и ПФК, продолжается в ПФК и практически завершается в ГК. Таким образом, ФЦ содержат рДНК, а также субъединицы Pol I, ДНК-топоизомеразы I и фактор UBF [18]. В ПФК происходит синтез, а также ранние стадии процессинга рРНК. Так, фибрилларин, Norp140 и малые ядрышковые РНК (мякРНК) участвуют в ранних стадиях процессинга рРНК и локализуются в ПФК [18–21]. Мутация основного сайта фосфорилирования казеинкиназой СК2 (мажорного белка гранулярного компонента нуклеофозмина (NPM/B23) человека) приводит к отделению ГК от ФЦ/ПФК, что свидетельствует о переходе между этапами сборки пре-40S и пре-60S субъединиц рибосомы на границе ПФК и ГК.

Ядрышковая стадия сборки предшественников SSU и LSU у дрожжей, которая завершается экспортом в нуклеоплазму, занимает разное время. Так, SSU покидают ядрышко примерно через 10 мин после начала сборки, почти вдвое быстрее LSU [21–23]. Распределение этапов созревания рибосом по разным структурам в архитектуре ядрышка у высших эукариот не определено.

Недавно были предложены новые механизмы, управляющие образованием ядрышек на основании многофазной организации, обусловленной разделением фаз жидкость–жидкость [13]. Предполагается, что пре-рРНК рекрутирует определенные белки, что приводит к разделению фаз. Пространственное разделение, физические и композиционные особенности субнуклеолярных фаз могут оптимизировать процессинг пре-рРНК, обеспечивая направленный транспорт и иерархию процессов сборки пре-рибосом. Ранние стадии процессинга пре-рРНК и ковалентная модификация высококонсервативных остатков в составе рРНК (метилование рибозы, оснований и псевдоуридилирование), которые существенны для структурной организации рибосомы и регуляции процесса трансляции [24–26], происходят в ПФК (рис. 2). Внешний ГК выполняет роль временного «карантина» для неправильно свернутых ядерных белков, которые накапливаются в стрессовых условиях [13, 27].

В протеоме ядрышек человека обнаружены гомологи ~90% дрожжевых белков ядрышка [28]. Классификация функций ядрышковых белков показывает, что ~30% из них связаны с биогенезом рибосом [29]. Нарушение регуляции функционирования ядрышковых белков может приводить к остановке клеточного цикла и апоптозу либо, наоборот, способствовать трансформации клеток и ускорять пролиферацию [30]. РБ также играют важную роль в процессе сборки, поскольку, как полагают, стабилизируют вторичную структуру рРНК, способствуя формированию третичных структур, компетентных для расщепления, и предотвращают неправильный фолдинг. РБ из клеток HeLa (32 белка) можно разделить на две категории в зависимости от их участия в ранних или поздних стадиях процессинга. Момент присоединения РБ к пре-рибосомам коррелирует с их вкладом на стадии расщепления РНК-предшественников [6]. Процессинг пре-рРНК является определяющим фактором формирования зрелых функциональных рибосом, и основное внимание в настоящем обзоре мы уделим именно последовательному созреванию продукта транскрипции Pol I – общего предшественника 18S, 5.8S и 25S/28S рРНК.

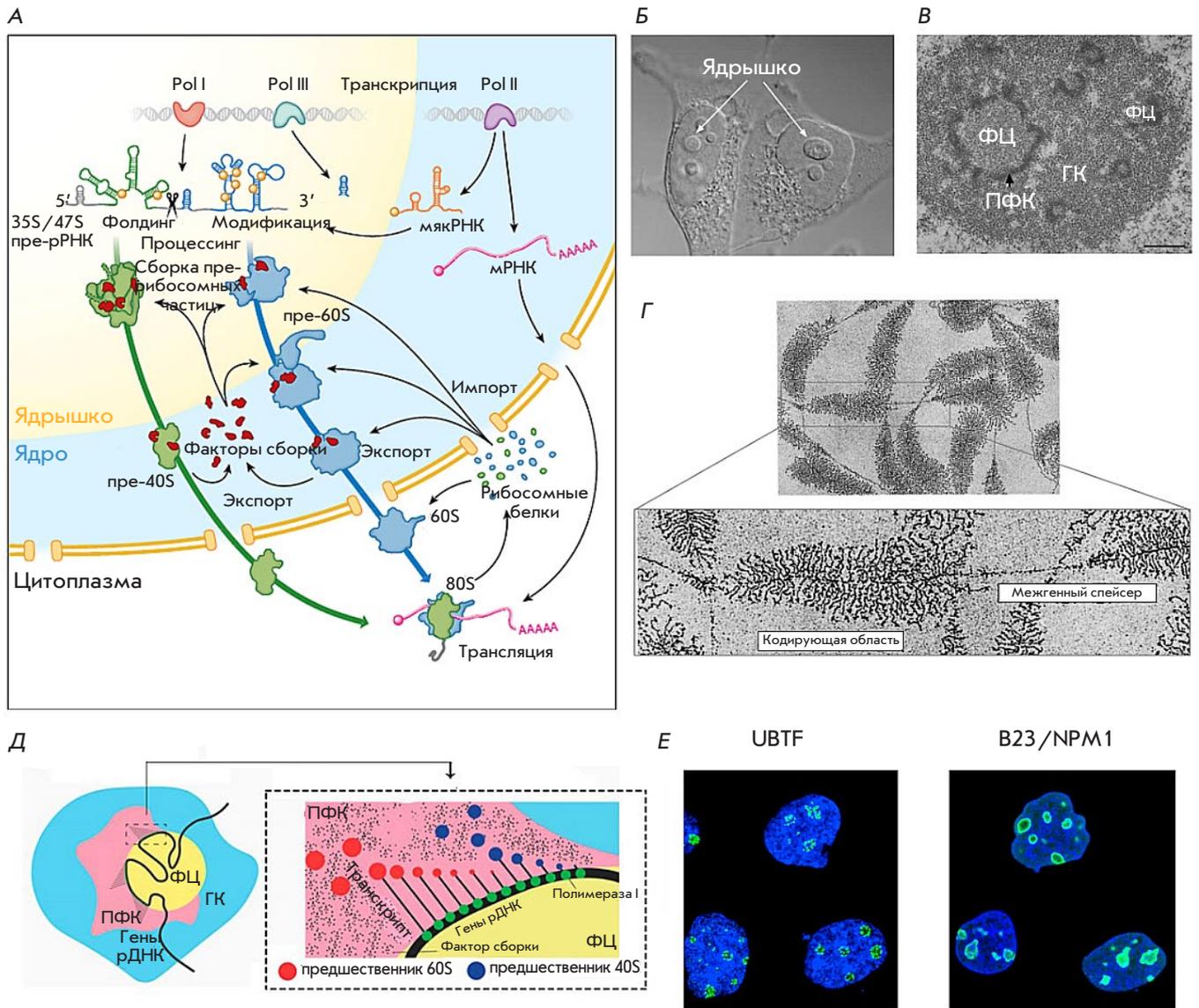


Рис. 2. Биогенез эукариотических рибосом. А – общая схема [5]; Б – ядрышки клеток HeLa, фазовый контраст [18]; В – электронная микрофотография ядрышка клеток HeLa. Показаны: гранулярный компонент (ГК), фибриллярные центры (ФЦ) и плотный фибриллярный компонент (ДФК) [19]; Г – тандемные повторы генов рибосомной и транскрибирующиеся рРНК ооцита тритона визуализированы по методу Миллера (<http://www.cellimagelibrary.org>); Д – взаимное расположение подотделов ядрышек человека [13]; Е – локализация факторов процессинга рибосом UBTF в ДФК и B23 в ГК ядрышек клеток человека A-43, окрашенных специфическими антителами (<https://www.proteinatlas.org/>)

БИОГЕНЕЗ РИБОСОМ

Основные стадии процессинга и различия в строении предшественников рРНК дрожжей и человека

В результате транскрипции генов рРНК образуется предшественник пре-рРНК (35S в дрожжах, 47S в клетках человека), в состав которого входят последовательности 18S, 5.8S и 25S/28S рРНК, фланкированные внешними транскрибируемыми спейсе-

рами (5'-ETS и 3'-ETS) и разделенные внутренними транскрибируемыми спейсерами (ITS1, между 18S и 5.8S; ITS2, между 5.8S и 25S/28S) (рис. 3). При последовательном созревании пре-рРНК образуются РНК-интермедиаты. Сворачивание протяженных рРНК – сложная задача, поскольку размер позволяет этим молекулам находиться в альтернативных стабильных нефункциональных структурах. В отличие от относительно слабых взаимодействий, которые поддерживают пространственную структуру

белков (например, альфа-спиралей и бета-листов), примерно половина рРНК со сформированной третичной структурой состоит из прочных двойных спиралей в А-форме [13]. Поэтому нелогичным представляется существование протяженных не-транскрибируемых спейсеров ETS и ITS (около половины первичного транскрипта рРНК), которые только усложняют структуру предшественников рРНК. Роль внешних спейсеров, по-видимому, состоит в том, чтобы снизить вероятность мутаций рРНК в результате ошибок РНК-полимераз, которые чаще возникают в 5'- и 3'-концевых частях транскриптов. Хотя последовательности спейсеров различаются, их концы эволюционно консервативны и складываются в несколько шпильчатых структур [31]. Последовательности некодирующего спейсера ITS1 менее консервативны [32], что затрудняет предсказание сайтов расщепления даже у близких видов. Последовательности ITS1 млекопитающих обычно в 2–3 раза длиннее, они имеют намного более высокое содержание G + C, чем у дрожжей (мышь – 70.1%; дрожжи – 35.2%) [33, 34].

Поскольку рРНК выполняет одновременно структурную и каталитическую функцию, то не удивительно, что ключевые аспекты созревания рибосомных субъединиц – это формирование структурных доменов в рРНК, сворачивание трехмерной структуры, а также сопутствующие этим процессам вырезание и удаление спейсеров из сложных РНК-комплексов. Кроме того, в состав предшественника большой субъединицы пре-60S должны быть включены 5S рРНК и ассоциированные с ней рибосомные белки (рис. 3) [6]. РНК-белковый состав комплексов рибосомных предшественников изучают с использованием комбинации биохимических подходов, в частности, нозерн-блотинга, быстрой амплификации концов кДНК (RACE) в сочетании с секвенированием ДНК, вестерн-блотинга с антителами к РБ и ФСР, а также масс-спектрометрии и криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ) высокого разрешения для характеристики элементов вторичной и третичной структуры. Сочетание этих методов позволило картировать основные сайты расщепления пре-рРНК у дрожжей, мыши и человека [6, 35] и определить белково-нуклеиновый состав и 3D-структуру отдельных комплексов.

Биогенез рибосом *Saccharomyces cerevisiae*, процессинг рРНК

Схема разрезания и укорочения концов пре-рРНК *S. cerevisiae* представлена на рис. 3А, Б. Rnt1 (гомолог РНКазы III) котранскрипционно гидролизует 3'-ETS по сайту В0 в первичных транскриптах 35S пре-рРНК [35–38]. Последующее расщепление

по сайтам А0, А1 и А2 взаимосвязано (рис. 3Б), а в быстрорастущих клетках в 50–70% случаев происходит котранскрипционное расщепление в ITS1. Расщепление по А0, А1 и А2 осуществляет SSU-процессома, содержащая мкРНК U3. Эндонуклеазы Utp24 и Rcl1 гидролизуют пре-рРНК по сайтам А1 и А2 соответственно [39, 40]. Продукты 20S и 27SA2 далее формируют SSU и LSU соответственно. 20S выходит в цитоплазму, превращаясь в 18S после расщепления по сайту D нуклеазой Nob1 (рис. 3).

Созревание пре-рРНК 27SA2 приводит к образованию альтернативных форм 27SB, отличающихся дополнительными 7–8 нуклеотидами на 5'-конце. Примерно 80% 27SA2 по сайту А3 расщепляет РНКазу MRP, а белки Rat1–Rail (Rrp17) укорачивают ее до сайта В1S (возможно, вместе с 5'-3'-экзонуклеазой Xrn1). Остальные 20% 27SA2 неизвестная РНКазы режет по сайту В1L, причем гидролиз по В1L и В2 происходит одновременно (рис. 3). В результате расщепления 27S В1S и В1L по сайту С2 внутри ITS2 образуются пре-рРНК 7S (предшественник 5.8S) и пре-рРНК 26S (предшественник 25S). РНК-экзосома, содержащая субъединицы Rrp6, Ngl2 и экзонуклеазу Rex, укорачивает пре-рРНК 7S до сайта Е, соответствующего 3'-концу 5.8S. Формирование 3'-конца 5.8S рРНК завершается в цитоплазме, возможно с участием Ngl2, которому приписывают функцию нуклеазы, активной и в ядре, и в цитоплазме. В результате нарушения кинетики процессинга пре-рРНК в точках от А0 до А2 могут образовываться aberrantные рРНК, что происходит при нокдауне генов белков, необходимых для процессинга по сайту А3 пре-рРНК 27SA2: Cic1, Erb1, Nop7, Nop12 и Nop1 (рис. 3) [41]. Неоптимальные условия роста, а также мутации, влияющие на синтез SSU или LSU, влияют на порядок разрезания РНК [42], что приводит к накоплению и расщеплению пре-рРНК 35S сразу в сайте А3, но не в А0, А1 и А2, с образованием 23S, aberrantного продукта, который, по-видимому, не пригоден для созревания 18S рРНК [43].

Процессинг пре-рРНК и присоединение рибосомных белков требуют многих вспомогательных ФСР, в число которых входят РНК-хеликазы, рибонуклеазы, GTP-азы и АТР-азы, РНК-шапероны, а также белки, не обладающие ферментативной активностью [44]. Некоторые ФСР временно блокируют переходы между структурами предшественников субчастиц, предотвращая неправильную укладку рРНК или преждевременное связывание ФСР и РБ, необходимых на более поздних стадиях сборки. По мере структурного «созревания» субъединиц связывание ФСР имитирует присоединение факторов трансляции или субстратов (например, тРНК или мРНК) и,

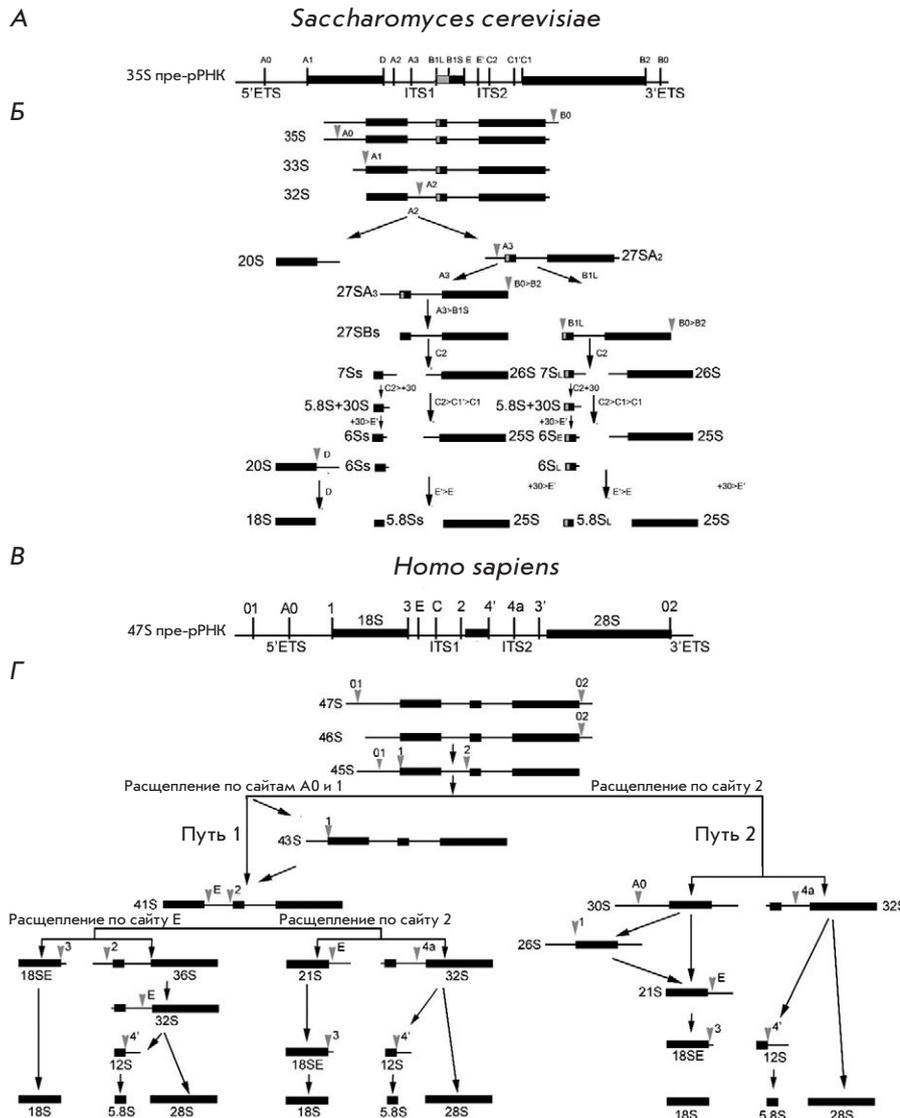


Рис. 3. Схемы созревания транскрипта 35S пре-рРНК у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (А) и транскрипта 47S пре-рРНК человека (В). Три из четырех рРНК: 18S, 5.8S и 25S (у дрожжей)/28S (у человека), синтезируются Pol I в виде одного длинного транскрипта. Кодированные последовательности «зрелых» рРНК окружают 5'-, 3'-ETS, ITS1 и ITS2 некодирующие спейсеры. На схеме показано взаимное расположение известных и предсказанных сайтов расщепления. Б – процессинг пре-рРНК у почкующихся дрожжей. Г – упрощенная схема процессинга пре-рРНК у человека. Первичный транскрипт, 47S пре-рРНК, первоначально расщепляется на обоих концах молекулы, по сайтам O1 и O2, образуя предшественник 45S, который процессируется по двум альтернативным путям [6]. Обозначение «>» (например, C2>C1'>C1) обозначает последовательное укорачивание соответствующих 3'- или 5'-концов пре-рРНК с помощью нуклеаз

блокируя связывание последних, исключает участие в инициации трансляции незрелых частиц.

Самый ранний крупный комплекс РНП–90S образуется котранскрипционно. Структуры ранних интермедиатов визуализированы при помощи методов крио-ЭМ [45, 46]. Одновременно с транскрипцией рРНК подвергается ковалентным модификациям, большинство из которых сгруппированы в функционально важных доменах и, как полагают, также обеспечивают формирование структуры рРНК [47]. В трехмерной структуре 80S рибосомы человека при помощи крио-ЭМ выявили модификации 130 отдельных положений рРНК (метилирования и псевдоуридинирования) [48]. Псевдоуридинирование осуществляют синтазы Cbf5 и Gar1, Nor10 и Nhp2, относящиеся к классу H/ACA мякРНП, а метилирование 2'-О-рибозы – белки, ассоциированные с C/D-бок мякРНК, такие,

как метилтрансфераза Nor1 (фибриллин у человека), гетеродимер Nor56–Nor58 и Snu13 [49, 50]. Внесение модификаций, вероятно, осуществляется во время транскрипции и первоначального сворачивания пре-рРНК, поскольку мякРНК более эффективно гибридизуются с частично развернутой пре-рРНК. Некоторые мякРНК, необходимые для сборки рибосом, не модифицируют пре-рРНК, а стабилизируют структуры, выгодные для сборки и созревания пре-рибосомных частиц. Предшественники субъединиц также модифицируют специфические метилтрансферазы [5, 51] и ацетилазы [52], не требующие участия мякРНК.

В сборке дрожжевых рибосом участвуют 19 РНК-хеликаз, включая хеликазы с DEAD-бок и DEAH-бок, но их роль в этом процессе пока остается неясной [53]. Три хеликазы (Has1, Mtr4 и Prp43) вовлечены в сборку обеих субъединиц [54, 55].

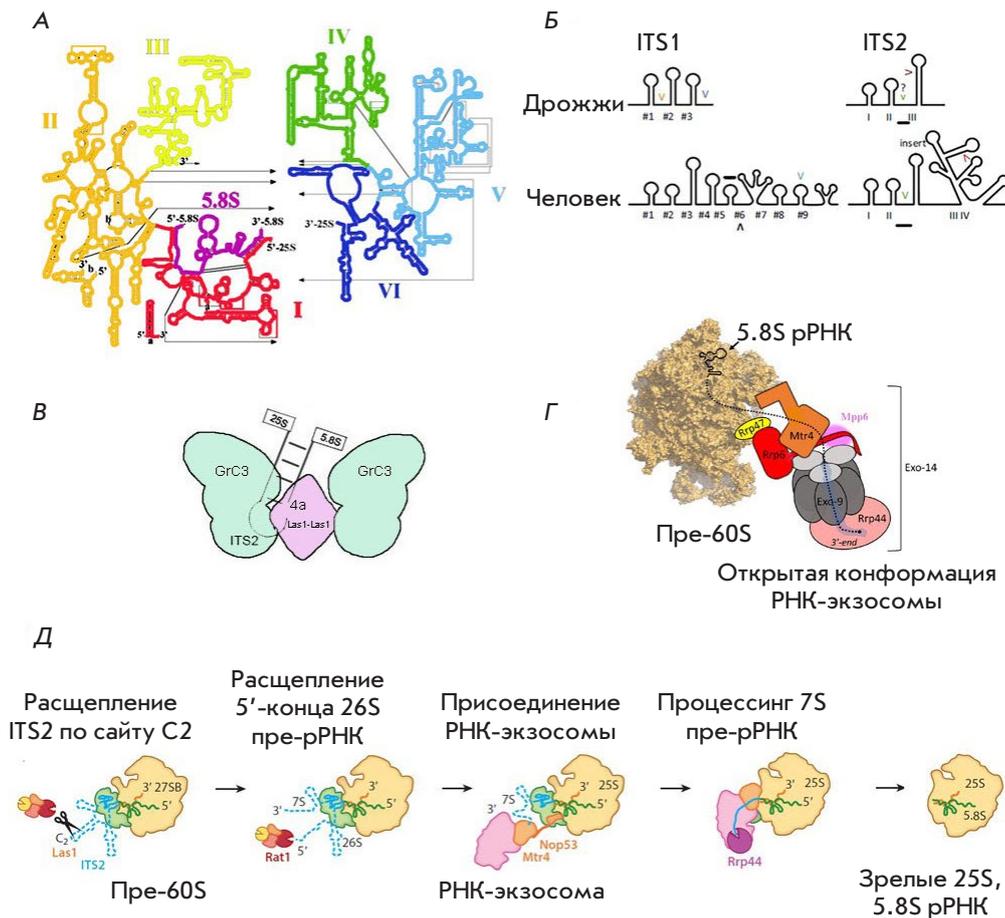


Рис. 4. Структура и созревание пре-рРНК дрожжей. А – 25S рРНК содержит шесть доменов (I–VI) вторичной структуры. 5.8S рРНК (показана черным) образует комплементарное взаимодействие с доменом I 25S рРНК (адаптировано из <https://crw-site.chemistry.gatech.edu/>). Б – схема вторичных структур ITS1 и 2 дрожжей и человека. Знаком «V» обозначены сайты расщепления. Предсказанные сайты отмечены знаками вопроса, подчеркиваниями обозначены сайты связывания экзонуклеазы у человека. В – модель процессинга ITS2 РНКазой РНК [49, 52]. Г – схема взаимодействия ядерной РНК-экзосомы с пре-60S [78]. Д – удаление ITS2 из частицы пре-60S путем действия ферментов процессинга РНК. Показаны промежуточные соединения во время удаления ITS2 [5]

Энергетику процесса обеспечивают GTP-азы (Bms1, Nog1, Nog2, Nug1, Lsg1 и Efl1), АТФ-азы (Rio1, Rio2 и Far7) и ААА-АТФазы (Mdn1, Drg1 и Rix7) [56]. Роль этих факторов заключается в поддержании необратимости процессов сборки.

Процессинг ITS2 дрожжей

ITS2 – структурный элемент, который служит основой для нескольких этапов сборки 60S, аналогично 5'-ETS на ранних стадиях созревания 18S рРНК. Удаление ITS2, расположенного между 5.8S и 25S рРНК, считается одним из наиболее сложных этапов сборки рибосом. Несмотря на небольшую длину (всего несколько сотен нуклеотидов), ITS2 дрожжей сильно структурирован и образует плотное консервативное ядро [57, 58]. Изучение структуры пре-рРНК *in vivo* показало, что ITS2 складывается в длинную шпильчатую структуру, на самом конце стебля которой расположен участок расщепления C2 (рис. 4) [59]. Нарушения последовательности и структуры шпильки блокируют процессинг ITS2, указывая на огромное значение для сборки рибосом [60, 61]. Как следует из крио-ЭМ-структуры, у основания пре-60S ITS2 уложен в форме лап

при участии нескольких факторов сборки [62–64]. Предложена модель, согласно которой ITS2 рРНК и связанные с ней факторы биогенеза (Nsa3, Nor7, Erb1, Rlp7, Nor15) облегчают гибридизацию 5.8S и домена I 25S рРНК. Правильность этой модели подтверждается данными о том, что мутации в этих белках ингибируют процессинг ITS2 на ранних стадиях [65–68].

Существует три фазы процессинга ITS2: (1) расщепление и фосфорилирование сайта C2 комплексом Las1–Grc3; (2) гидролиз 5'-конца экзонуклеазой Rat1; (3) гидролиз 3'-конца РНК-экзосомой (рис. 4). Процессинг ITS2 активирует тетрамерный комплекс ферментов из двух димеров эндонуклеазы семейства HEPN Las1 с полинуклеотидкиназой Grc3 (функционируют только в виде димеров, уровень белков регулируется) [69]. N-Концевой домен HEPN содержит каталитический мотив RφxxxH (φ – это H, D или N, а x – любая аминокислота) [70]. Дефицит ортолога Las1 дрожжей, LAS1L (Las1-like) млекопитающих, приводит к ингибированию процессинга ITS2 и пролиферации клеток [71]. Истощение клеток дрожжей по Las1 также блокирует процессинг ITS2, что указывает на консервативность функций Las1 в про-

цессинге ITS2 у эукариот [69, 72]. Расщепление C2 и фосфорилирование являются связанными процессами, фосфорилирование препятствует повторному лигированию продуктов расщепления C2, 7S пре-рРНК с 2'-3'-циклофосфатом и 26S пре-рРНК с 5'-гидроксилем [60, 61, 73]. Grc3 рекрутирует 5' → 3' экзонуклеазу Rat1 (Xrn2 млекопитающих) к сайту C2 26S пре-рРНК [61, 74, 75]. Rat1/Xrn2 (не специфичная к определенной последовательности) гидролизует одноцепочечную РНК с концевым 5'-монофосфатом, в направлении 5' → 3' [76]. Дрожжевая Rat1 и активирующий ее кофактор, нуклеаза Rai1, образуют димерный комплекс, который связывает Las1-Grc3 через Grc3 [73] в пре-60S частицах [73, 76, 77]. Связь между Rat1-Rai1 и Grc3 достаточно слабая, что подразумевает дополнительные взаимодействия в сайте C2 [60, 73, 78]. Аминокислотные последовательности Grc3/No19 и Rat1/Xrn2 очень консервативны, что предполагает консервативность Grc3-зависимого рекрутирования Rat1 к сайту C2. Детали молекулярного взаимодействия Grc3/No19 с Rat1/Xrn2 неизвестны, что затрудняет понимание механизма укорочения 5'-конца ITS2.

РНК-экзосома гидролизует 3'-конец 7S пре-рРНК после разрезания 5'-конца ITS2 (рис. 4). РНК-экзосома представляет собой мультисубъединичный 3' → 5'-рибонуклеазный комплекс, гидролизующий любые известные формы РНК [79, 80]. В ее составе выделяют ядро из 9 субъединиц (Ехо-9), образующих двухслойное кольцо с центральным каналом (рис. 4) [78, 79, 81–83]. Ядро Ехо-9 не обладает каталитической активностью и нуждается в многочисленных партнерах для деградации РНК. Каталитическая активность РНК-экзосомы зависит от фермента Rrp44, обладающего экзонуклеазной и 3' → 5'-экзонуклеазной активностью [84, 85]. Rrp44 связывает ядро Ехо-9, образуя комплекс Ехо-10 [79, 81], который взаимодействует с дополнительной 3' → 5' нуклеазой, Rrp6, формируя Ехо-11 [82, 86–89]. Дополнительные белки Mpp6, Rrp47 и Rrp6 привлекают в экзосому кофактор Mtr4, который усиливает связывание комплекса с пре-рибосомами. Взаимодействие Mtr4 с Nor53 направляет Ехо-11 к ITS2, а с Utp18 – к 5'-ETS (рис. 4Д) [90]. Хеликаза Mtr4 расплетает конец ITS2 в направлении 3' → 5' [91–93], обеспечивая Rrp44 возможность гидролизовать 3'-конец пре-рРНК 7S. Результирующий транскрипт кодирует 5.8S с довеском из 30 нуклеотидов ITS2 (рис. 4) [92, 94, 95]. Далее ITS2 расщепляет нуклеаза Rrp6, формируя 6S пре-рРНК [92]. Недавняя крио-ЭМ-структура РНК-экзосомы показала, что она претерпевает структурные перестройки при связывании с пре-60S [78, 96], образуя внутри ядра РНК-экзосомы канал, через который

7S пре-рРНК попадает в активный сайт экзонуклеазы Rrp44 [78, 95, 96] (рис. 4).

Процессинг рРНК человека

Процессинг 18S рРНК человека включает больше шагов, чем в клетках дрожжей [23, 35] (рис. 3). На первом этапе процессинга первичный транскрипт 47S (рис. 3) укорачивается с обоих концов по сайтам A0 (или 01) и 02 с высвобождением 5'- и 3'-ETS, соответственно, и образованием предшественника 45S пре-рРНК (рис. 3), который затем укорачивается посредством двух альтернативных путей. В клетках человека расщепление 47S пре-рРНК в сайтах A0 и 02 скоординировано во времени. Нарушение этой координации приводит к накоплению интермедиата 46S. 45S пре-рРНК процессируется с помощью параллельных путей (1 и 2) с образованием многочисленных промежуточных продуктов (рис. 3Г). Важную роль в процессинге (помимо экзонуклеаз) играют также экзонуклеазы, укорачивающие рРНК с концов.

Часть молекул пре-рРНК человека расщепляется, по-видимому, котранскрипционно, как и в клетках дрожжей. Предполагается, что у млекопитающих пре-рРНК котранскрипционно расщепляется только по сайту A' [97]. Стоит отметить, что существуют условия, благоприятствующие одному из альтернативных путей. Например, мутации в U3 или U8 мякРНК нарушают порядок расщепления пре-рРНК [98]. Первое расщепление 47S пре-рРНК происходит по сайту 01, расположенному на несколько сотен нуклеотидов ниже старта транскрипции, в области связывания C/D мякРНК U3 в 5'-ETS. Порядок расщепления предшественников зависит также от вида и типа клеток, физиологических условий и стадий клеточного цикла и нарушается при патологиях [6, 99–101].

Ключевые ФСП и РБ, участвующие в процессинге пре-рРНК, а также анализ различий в аппарате процессинга рРНК дрожжей и человека будут приведены при рассмотрении деталей сборки отдельных предшественников SSU и LSU.

Хотя синтез и созревание рРНК являются ключевыми событиями в биогенезе субъединиц рибосом, не меньшее значение имеют и другие аспекты этого процесса, такие, как включение в структуру на определенных этапах рибосомных белков, а также ФСП (рис. 5). В процессе сборки рибосом реализуются четыре основных принципа: (1) постепенное снижение конформационной свободы пре-рРНК; (2) последовательность и временная динамика связывания отдельных факторов сборки, обеспечиваемых молекулярной мимикрией и молекулярными переключателями; (3) необратимость ключевых кон-

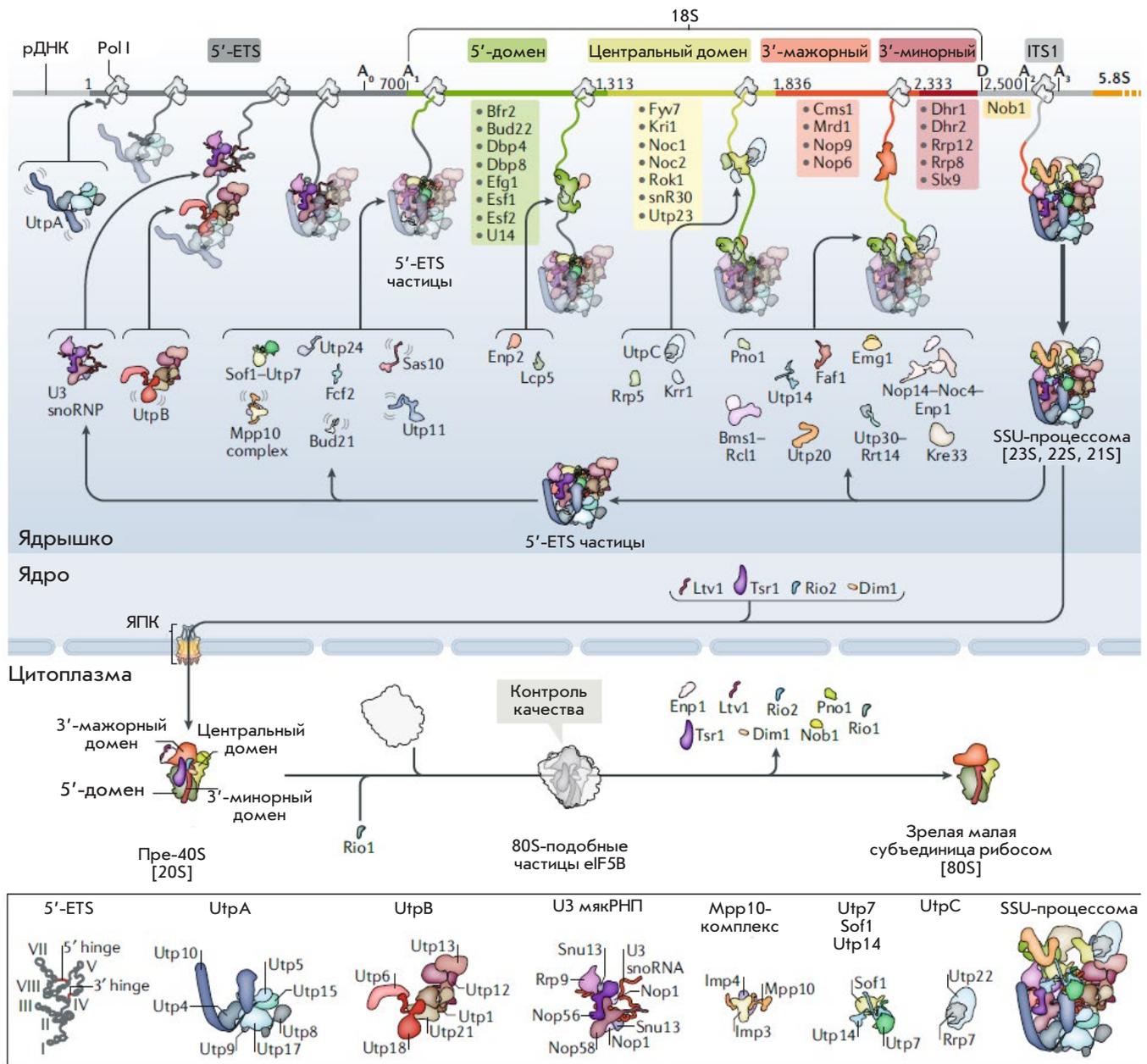


Рис. 5. Факторы и комплексы, участвующие в сборке малой субъединицы дрожжей. Показаны основные стадии созревания 40S субъединицы дрожжей. Сверху представлена рДНК, в которой выделены основные домены 18S рРНК: 5'-ETS, ITS1, 5'-домен, центральный домен, 3'-мажорный, 3'-минорный домены. Там же указаны сайты (A0, A1, D и A2). Ниже приведены промежуточные пре-рибосомные частицы: комплекс 5'-ETS, процессома SSU и пре-40S. Промежуточные компоненты комплексов пре-рРНК указаны в квадратных скобках под каждой частицей. На данном рисунке приведены факторы сборки рибосом и комплексы с известной структурой в виде изображений, структуры которых не установлены – в виде текстовых аббревиатур. Белки, которые присоединились к растущей процессоме SSU на более ранней стадии, показаны как «прозрачные», в отличие от новых, непрозрачных компонентов. Адаптировано из [44]

трольных точек, которая зависит от потребления энергии и ферментов, изменяющих длину и структуру РНК; (4) структурная и функциональная коррекция функциональных центров обеих рибосомных субчастиц.

Сборка 90S пре-рРНК

По мере выхода транскрипта из контакта с Pol I 5'-ETS рРНК складывается в структуры «стебель–петля», создавая платформу для присоединения ФСР, РБ, а также сворачивания четырех доменов SSU

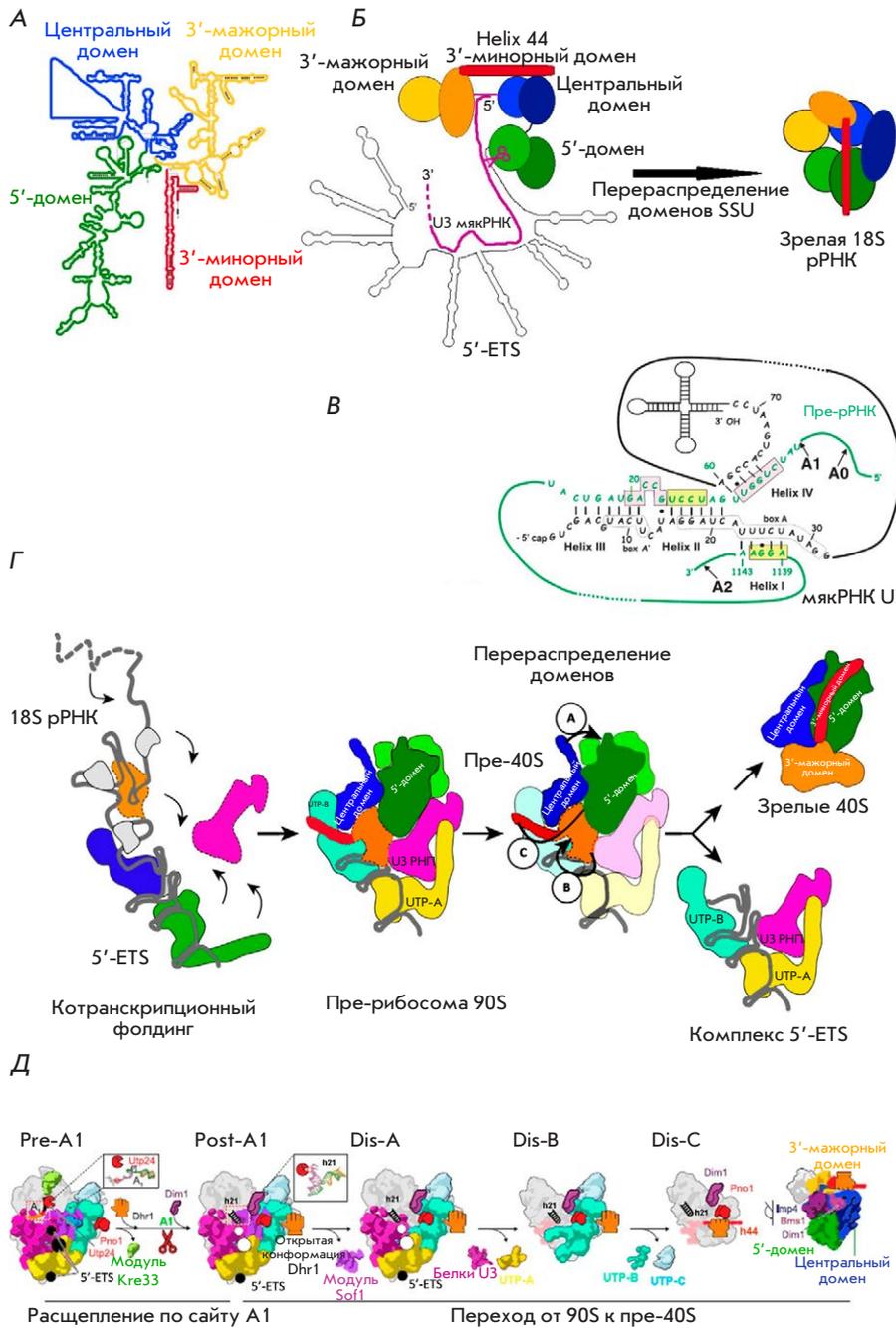


Рис. 6. Схема доменных перестроек при созревании 40S субъединицы. А – 18S рРНК содержит три домена вторичной структуры: 5'-домен, центральный домен, 3'-мажорный и 3'-минорный домены (адаптировано из <https://crw-site.chemistry.gatech.edu/>); Б – схематическое изображение процессомы SSU (слева) и зрелой 18S (справа). Домены 18S представлены в виде геометрических фигур разного цвета: зеленый – 5'-домен, синий – центральный, желтый – 3'-мажорный, красный прямоугольник – 3'-минорный домен, розовая линия U3 рРНК [13]; В – взаимодействие пар оснований между дрожжевой U3 мякРНК и 18S частью дрожжевой пре-рРНК. Три детально описанных взаимодействия между Box A и Box A' в мякРНК U3 и тремя сегментами 18S части пре-рРНК, которые участвуют в формировании структуры центрального псевдоузла в зрелой 18S рРНК [23, 35]; Г – модель образования 90S и ее превращения в пре-40S. Модули мякРНК UTP-A (желтый), UTP-B (голубой) и U3 (розовый) котранскрипционно связываются с 35S пре-рРНК. Дальнейшее уплотнение приводит к образованию 90S комплекса. Общая укладка 5'-домена 18S рРНК напоминает «зрелую» конформацию, но при трансформации пре-40S пре-рибосомы 90S в зрелую малую 40S субъединицу необходимы структурные перестройки в центральном, 3'-мажорном (оранжевый) и 3'-минорном (красный) доменах [23, 35]. Д – схема трансформации 90S в пре-40S при расщеплении A1. Модули факторов сборки и выбранные белки окрашены и помечены соответствующим образом. Хеликаза Dhr1 показана в виде хватальной руки

(рис. 6А). Поскольку эти структуры формируются котранскрипционно, они создают сайты посадки ряда комплексов ФСР, включая молекулярные шапероны UTP-A, UTP-B и мякРНК U3, обеспечивая упорядоченность сборки. На этом этапе основную роль играют шпильчатые структуры, образуемые 5'-ETS (рис. 6А, Б) [44]. Значительная вариабельность первичных структур 5'-ETS и ITS разных видов свидетельствует о ключевой роли в биогенезе рибосом пространственной структуры, формируемой этими элементами [102]. Спариваясь с основаниями

рРНК, U3 мякРНК делает структуру рРНК жесткой. В крио-ЭМ-структуре 90S можно выделить частично выступающий комплекс 3'-концевой части мякРНК U3 с основными факторами C/D-box (Nor1, Nor56, Nor58, Snu13, Rrp9). Одноцепочечная 5'-концевая часть U3 глубоко проникает внутрь частицы SSU, гибридизуясь с короткими консервативными нуклеотидными последовательностями 18S рРНК и 5'-ETS (рис. 6Б). Этот процесс сопровождается образованием 5'- и 3'-петель и способствует выщеплению 18S пре-рРНК за счет образования Box A и Box

Таблица 1. Факторы сборки малой рибосомной субъединицы [44]

Факторы биогенеза рибосом компонента SSU у <i>Saccharomyces cerevisiae</i>					
Номер кластера			Человек	<i>S. cerevisiae</i>	Функция
2	2	8	DDX47	Rrp3	DEAD-бокс-хеликаза
6	2	2	DDX49	Dbp8	DEAD-бокс-хеликаза
1	1	1	DDX42	Rok1	DEAD-бокс-хеликаза
1	1	1	EIF4A3	Fal1	DEAD-бокс-хеликаза
2			Rrp36	Rrp36	Структурный
11	11		MYBBP1A	Pol5	То же
2	2		ABT1	Esf2	«
1	1	1	Esf1	Esf1	«
3			Utp23	Utp23	«
4	4	11	NOC2L	Noc2	«
8	3	3	RBM19	Mrd1	«
		2	C14orf21	Nop9	«
1			Rrp8	Rrp8	pРНК-метилтрансфераза
				Компоненты H/ACA	
		2	Gar1	Gar1	Кофактор псевдоуридинсинтазы
2	2		Nhp2	Nhp2	Кофактор псевдоуридинсинтазы
			Nop10	Nop10	Кофактор псевдоуридинсинтазы
				Комплекс UtpA	
2	2	2	CIRH1A	Utp4	Структурный
2	2	5	WDR43	Utp5	То же
2	2		HEATR1	Utp10	«
1	1	1	Utp15	Utp15	«
5	5	2	WDR75	Utp17/Nan1	«
				Комплекс UtpB	
2	2	2	PWP2	Utp1/Pwp2	«
2	8	8	Utp6	Utp6	«
2	2	2	WDR3	Utp12	«
2	2	2	TBL3	Utp13	«
2	2		Utp18	Utp18	Структурный, несет мотив связывания экзосомы
2	2	2	WDR36	Utp21	Структурный
				U3 snoRNP	
2	2	2	Nop56	Nop56	ВохС/Д мякРНК основной компонент
2	2		Nop58	Nop58	ВохС/Д мякРНК основной компонент
2	2	2	FBL	Nop1	ВохС/Д мякРНК основной компонент
2	2	11	NHP2L1	Snu13	ВохС/Д мякРНК основной компонент
2	2	2	Rrp9	Rrp9	Специфический фактор U3 мякРНК
				Комплекс Mpp10	
8	8	8	MPHOSPH10	Mpp10	Структурный
2	2	2	Imp3	Imp3	То же

Факторы биогенеза рибосом компонента SSU у <i>Saccharomyces cerevisiae</i>					
Номер кластера			Человек	<i>S. cerevisiae</i>	Функция
2	2	8	Imp4	Imp4	«
				Отдельные факторы	
	2	8	DCAF13	Sof1	«
8	8	8	WDR46	Utp7	«
2		2	DNTTIP2	Fcf2	«
2	2	8	FCF1	Utp24	A1, A2 нуклеаза
1	2		UTP3	Sas10/Utp3	Структурный, несет мотив связывания экзосомы
2	2	8	UTP11L	Utp11	Структурный
				5'-домен	
2	2	8	AATF	Bfr2	То же
2	2	8	NOL10	Enp2	«
2	2	2	NOL6	Utp22	«
				Центральный домен	
2	8	8	RRP7A	Rrp7	«
8	8	4	PDCD11	Rrp5	«
1	2		Krr1	Krr1	«
1	2		BYSL	Enp1	«
				3'-главный домен	
2	2	2	NOP14	Nop14	«
2	2	2	NOC4L	Noc4	«
7	7	7	Rrp12	Rrp12	«
1			NAT10	Kre33	Цитозин ацетилтрансфераза/хеликаза
1	2	2	Bms1	Bms1	GTP-аза
2	2		Rcl1	Rcl1	Структурный
1	1		EMG1	Emg1/Nep1	pРНК-метилтрансфераза
4	4	4	RSL1D1	Utp30	Структурный
6	6	6	Pno1	Pno1	То же
2	2	8	Utp20	Utp20	«
8	8	4	UTP14A	Utp14	Dhr1-связывание
				Rrt14	«
				Faf1	«
				Dhr1	DEAH-бокс-хеликаза
2			Nob1	Nob1	Нуклеаза сайта D
	5	5	DHX33	Dhr2	DEAH-бокс-хеликаза
1			DHX35		
1	1		C1orf107	Utp25	Структурный
10	10	10	WBSCR22	Bud23	pРНК-метилтрансфераза
			TRMT112	Trm112	Адаптор метилтрансферазы
9	9	9	Ltv1	Ltv1	Структурный
		4	Tsr1	Tsr1	То же
		4	RIOK1	Rio1	«
	10		RIOK2	Rio2	«
			CSNK1A1	Hrr25	Казеинкиназа
4	8		DIMT1L	Dim1	pРНК-деметиلاза

A' [44, 103–109] (рис. 6Б). Непосредственная близость этих сайтов к 5'-области U3 мякРНК обеспечивает критическое пространственное ограничение, задающее топологию созревающей частицы. Комплекс, содержащий свернутый 5'-ETS 18S пре-рРНК с нерасщепленным сайтом A1 и ранние РБ, внедряется в структуру, образованную факторами биогенеза (~60 белков) и мякРНК U3 (рис. 6, табл. 1). Для своевременного расщепления в сайтах A1 и A2 необходимо зависящее от U3 формирование конформации 35S пре-рРНК, которая препятствует образованию центрального псевдоузла – характерной структуры, расположенной в центре декодирования в зрелой 18S рРНК (рис. 6). Ряд ранних ФСР (Utp11, Sas10, Mpp10 и Fcf2) (рис. 5) ограничивают домены пре-рРНК внутри частицы, связываясь либо с белком, либо с элементами РНК. В 90S пре-рибосоме только 5'-домен имеет конформацию, близкую к зрелой, и, соответственно, содержит РБ (рис. 6). Центральный домен виден только частично, а 3'-концевые домены невозможно распознать в структуре 90S. Таким образом, сворачивание зарождающейся 18S рРНК происходит в направлении от 5'- к 3'-концу, но блокируется на промежуточных стадиях, которые требуют привлечения дополнительных ФСР (рис. 5, 6). В структуре 90S субчастицы обнаружена GTP-аза Bms1. Считается, что этот фермент после гидролиза GTP инициирует конформационные изменения, необходимые для процессинга пре-рРНК и превращения 90S в пре-40S субчастицу. В соответствии с этой гипотезой, Bms1 расположен на границе раздела ряда доменов пре-18S, контактируя с несколькими ФСР, стабилизирующими переходную структуру 90S (рис. 5).

Приблизительно 18 из 60 ФСР в частице 90S представляют собой β -пропеллерные белки, служащие основой для межбелковых взаимодействий, которые обычно формируются в процессе образования макромолекулярных комплексов [110]. Кроме того, несколько белков с повторами Trp и Asp (WD) в составе 90S связываются непосредственно со специфическими сайтами рРНК. Другая большая группа ФСР 90S – это α -спиральные белки. Большие белки Utp20 (~220 кДа) и Utp10 (~180 кДа) связаны друг с другом, достигая отдаленных областей на частице 90S своими длинными α -спиралями. Например, Utp10 простирается от основания 90S, где расположен 5'-ETS, до вершины 90S (5'-домен), где он связывается с Utp20, обернутым вокруг головы частицы 90S (рис. 5, 6). Такие отдаленные контакты облегчают связь между различными областями и/или способствуют распознаванию конформации, общей для согласования этапов созревания [5]. Некоторые факторы биогенеза 90S частично или полностью развернуты. Эти полипептиды нахо-

дятся как на поверхности, так и глубоко погружены в структуру 90S субчастиц. В качестве типичного примера можно привести Mpp10, который, наматываясь вокруг 90S, контактирует с Imp3, Imp4, Bms1, Utp12, Utp13 (UTP-B) и некоторыми частями 18S рРНК (рис. 5, 6). Аналогично, Nop14 своими длинными N- и C-концевыми участками связывает Noc4, Emg1 и Rcl1. Эти элементы не только стабилизируют комплекс 90S, но и участвуют в дальних взаимодействиях и/или в конформационном зондировании [5].

Последний этап преобразования 90S – стадия отделения комплекса пре-40S. Этот шаг тесно связан с расщеплением предшественника 35S по сайтам A1 и A2 на первом этапе пути биогенеза предшественника большой субчастицы 60S. Интересно, что Utp24 расположен близко к сайту A1 в частице 90S, но не может выполнять свою функцию, потому что другой ФСР, Sof1, маскирует сайт расщепления A1. Таким образом, для перехода пре-рибосомы 90S на следующую стадию сборки требуются значительные конформационные перестройки, вызванные взаимодействием с ней новых ФСР (например, хеликаз) и/или гидролизом макроэргических связей. В частице 90S присутствует несколько дополнительных ферментов, например, ацетилтрансфераза Kre33 или метилтрансферазы Nop1 и Emg1. Несмотря на то что РНК-хеликазы вовлечены в структурные перестройки РНК, включая диссоциацию мякРНК, в 90S комплексе они отсутствуют. Можно предположить, что переход 90S в пре-40S стимулируется хеликазой Dhr1/Ecm16, так как показано, что она нарушает спаривание оснований между мякРНК U3 и пре-рРНК и участвует в отщеплении 5'-ETS [111, 112]. Многие факторы связывают пре-рРНК временно и только до расщепления по сайту A2. К ним относят небольшие РНК (U14, snR10 и snR30 [113, 114]) и белки, которые связаны с каждым из субдоменов 18S рРНК [115–117], хотя их роль в настоящее время мало понятна (рис. 5).

Взаимодействие белков, таких, как Mpp10, Utp11 и Sas10 (рис. 5), и спаривание оснований мякРНК U3 с 5'-ETS и 18S рРНК (рис. 5) обеспечивают дополнительную устойчивость частицы, преимущественно действуя как локальные стабилизаторы структурных элементов РНК [31, 44]. Белки, содержащие спиральные повторы (Nop14, Noc4, Rrp5, Utp10 и Utp20) и играющие в основном структурную роль, а также некоторые ферменты, такие, как метилтрансфераза Emg1 [118], ацетилтрансфераза-хеликаза Kre33 [52] и GTP-аза Bms1 [31, 52], расположены во внешних областях процессомы SSU. Временной порядок, в котором ферменты действуют на инкапсулированные пре-18S рРНК, еще предстоит определить.

Переход от 90S пре-рРНК к 40S пре-рРНК. Отделение 5'-ETS

Ингибирование РНК-экзосомы в результате мутации в Utp18 [53] или остановка сборки 90S на укороченной с 3'-конца пре-рРНК [46, 119, 120] стабилизируют комплекс 5'-ETS РНК с UTP-A, UTP-B, U3 мякРНК и рядом других факторов биогенеза, отделяемый на этапе перехода от 90S к пре-40S субчастице [5, 53]. Деградация 5'-ETS РНК-экзосомой должна приводить к рециркуляции факторов биогенеза [90, 91].

Дальнейшие этапы созревания требуют координированного расщепления по сайту A1 5'-ETS и A2 ITS1, что служит сигналом к разделению 18S рРНК и 5.8S/25S рРНК (рис. 6) [5, 36, 44].

Диссоциация факторов обеспечивает возможность образования контактов между четырьмя доменами 18S рРНК, что уплотняет структуру (рис. 6). Крио-ЭМ-структуры, показывающие переход от 90S к пре-40S, позволили выявить семь промежуточных состояний пре-рибосомных частиц Pre-A1, Post-A1, Dis-C, Dis-A и Dis-B, последовательно сменяющих друг друга в процессе биогенеза (рис. 6Д) [121].

В состоянии Pre-A1 наблюдается позиционирование спирали h21 пре-18S рРНК в ее зрелое/правильное положение (рис. 6Д). Одновременно с расщеплением по сайту A1 изменения структуры приводят к образованию промежуточного продукта Post-A1. Последовательная диссоциация нескольких модулей факторов сборки через промежуточные состояния Dis-C, Dis-A и Dis-B приводит к постепенному упрощению комплекса при сохранении основных взаимодействий в 90S субчастице. Вероятно, решающий шаг в демонтаже промежуточного продукта 90S зависит от степени созревания доменов пре-40S, что отражается в степени его уплотнения. Уплотнение рРНК происходит в результате ремоделирования структуры рРНК и РНК, что делает возможным образование центра декодирования [44]. Степень уплотнения может быть сигналом разборки каркаса 5'-ETS, что видно из структур, предшествующих расщеплению A1 [90]. Это предположение согласуется с зависимостью расщепления A1 от активности хеликазы Mtr4, возможно, ремоделирующей 5'-ETS [103]. Поворот и смещение спиралей РНК, начинающиеся в 3'-области 5'-ETS, делают возможным перемещение Pno1 и h45 и, одновременно, присоединение хеликазы Dhr1, которая формирует часть спирали h1 рРНК, необходимой для разрезания A1 эндонуклеазой Utp24. Этот сложный процесс сопутствует диссоциации нескольких факторов, дальнейшей дестабилизации промежуточного 90S комплекса и вытеснения 5'-ETS. В результате происходит высвобождение РНК-белковых комплексов и образование пре-40S (рис. 5) [121].

Экспорт пре-40S частиц

Внутри 90S комплекса образуется пре-рРНК 20S (рис. 3), которая содержит 18S рРНК и часть ITS1. Пре-рРНК 20S является компонентом самых ранних пре-40S частиц. Пре-40S связываются с несколькими ФСР – белком ядрышка Tsr1 и цитоплазматическими белками Ltv1, Rio2 и Nob1 (рис. 5) – и быстро транспортируются в цитоплазму. Из-за большого размера пре-рибосомы перемещаются через ядерные поры по одной. Кариоферин Crm1/Xpo1 при участии Ran/Gsp1 переносит их в цитоплазму GTP-зависимым способом [122]. Rrp12 вместе с Crm1 связывается с 90S и участвует в процессинге 35S пре-рРНК по сайту A0 [123]. Снижение количества Rrp12 либо Crm1 вызывает накопление пре-40S комплекса в нуклеоплазме [124]. По крайней мере три ФСР: Dim2, Ltv1 и Rio2, присутствующие в пре-40S частицах, содержат предсказанные или функциональные сигналы экспорта из ядра, но ни один из них по отдельности не является необходимым для экспорта. Функции других факторов, участвующих в экспорте субъединиц пре-40S, на настоящий момент не установлены.

Процессинг пре-40S субчастиц в цитоплазме

Частицы пре-40S, согласно данным, полученным биохимическими и структурными методами, имеют относительно простой состав ФСР при переходе к зрелой структуре 18S рРНК. Первая структура частицы пре-40S, полученная при помощи крио-ЭМ, выявила почти сформированные 5'- и центральный (платформенный) домены, тогда как 3'-домен (области «головы» и «клюва») еще не достиг зрелой конформации. Пре-40S субчастица, попавшая в цитоплазму, содержит семь ФСР, способствующих событиям позднего созревания (рис. 7). В цитоплазме происходят два основных события: структурные перестройки, формирующие «клюв», и расщепление 20S пре-рРНК по сайту D эндонуклеазой Nob1. Они тесно связаны с механизмами контроля качества и проверкой функциональных центров, которые гарантируют, что рибосомные субъединицы трансляционно компетентны [125]. Созреванию «клюва» способствует высвобождение ФСР и факторов экспорта, стабильное присоединение нескольких рибосомных белков и конформационная перестройка, результатом которой является формирование сайта декодирования. Фосфорилирование белков Ltv1 и Enp1 киназой Hrr25 позволяет им вытеснить и правильно разместить зрелый белок Rps3, что способствует Nob1-зависимому расщеплению 20S пре-рРНК по сайту D [122].

Данные крио-ЭМ частиц пре-40S дрожжей и человека выявили значительное структурное подобие позиций ассоциированных поздних ФСР, которые за-

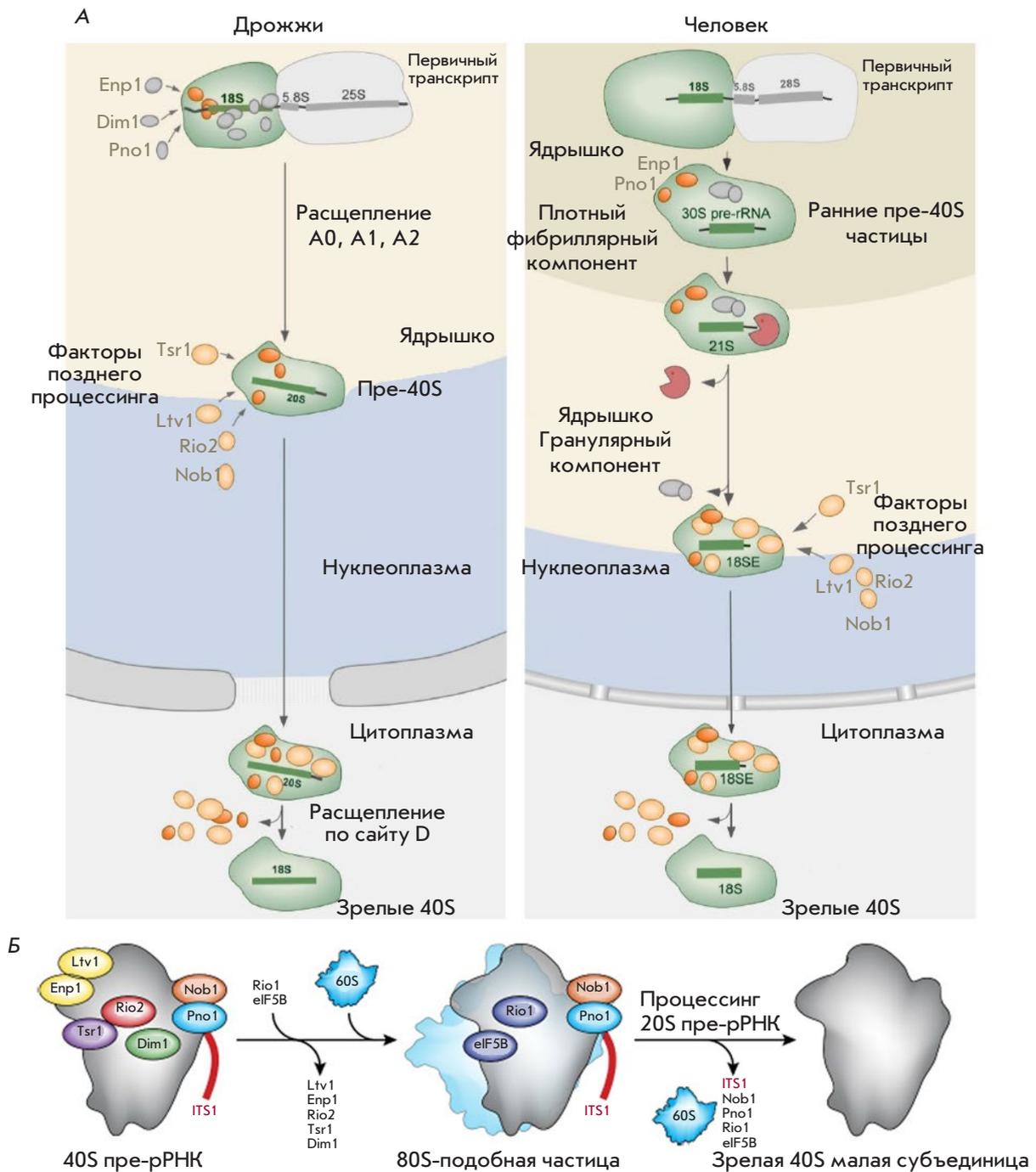


Рис. 7. Поздние стадии созревания субъединиц рибосом человека и дрожжей и субклеточная локализация основных участников сборки. **А** – промежуточные продукты пре-рибосомы 40S у дрожжей *S. cerevisiae* (слева) и у человека *H. sapiens* (справа). Стабильное выявление двух дополнительных пре-рРНК (30S и 21S) в клетках человека указывает на то, что существуют по крайней мере две отдельные стадии раннего созревания, которые не наблюдаются у дрожжей. Сходные составы цитоплазматических частиц пре-40S предполагают сходство позднего созревания у дрожжей и человека. **Б** – схема контроля качества цитоплазматической субъединицы пре-40S. Указаны только факторы сборки с известными сайтами связывания [125]

нимают функционально важные сайты и блокируют формирование функциональных рибосом [5, 126–128]. В частности, ФСР Tsr1, Enp1, Rio2 и Pno1/Dim2 совместно контролируют неполностью сформированные сайты в составе пре-40S: центр декодирования и мРНК-связывающую канавку (рис. 7). На ранних этапах Enp1 и Ltv1 занимают сайт связывания рибосомного eS10 в 3'-мажорном домене («голова» и «клюв»), диссоциируя при фосфорилировании протеинкиназой Hrr25 [5, 129–131]. Диссоциация Enp1/Ltv1 приводит к присоединению eS31 и перемещению С-концевого домена uS3, что стабилизирует взаимодействие между «телом» и «головой» 40S [132]. Механизм своевременного расщепления 20S пре-рРНК эндонуклеазой Nob1 может быть объяснен с помощью крио-ЭМ-структур. РНК-связывающий белок Pno1 маскирует сайт расщепления на 3'-конце зрелой 18S рРНК. Конформационная перестройка и взаимодействие пре-40S субчастицы со зрелой 60S субчастицей являются проверочными шагами, необходимыми для взаимодействия с Nob1, осуществляющей превращение 20S пре-рРНК в 18S рРНК [5, 38, 133–137]. Крио-ЭМ-анализ поздних пре-40S частиц человека подтверждает модель, в которой Rio1-АТФ взаимодействует с рибосомным белком RPS26, вытесняя Dim2 с 3'-конца 20S пре-рРНК. В результате, пре-рРНК становится доступной для взаимодействия

с эндонуклеазой Nob1. Гидролиз АТФ и высвобождение ADP приводят к диссоциации комплекса Rio1 и 40S субъединицы. Механизм блокировки с двумя ключами – Rio1 и RPS26 – гарантирует согласованность преобразования частиц в компетентные для трансляции 40S субчастицы [138]. Координация образования 80S-подобной частицы с окончательным созреванием 18S рРНК гарантирует, что только правильно собранные 40S субчастицы будут участвовать в трансляции.

Таким образом, несмотря на обилие данных, полученных для *S. cerevisiae*, и высокую консервативность биогенеза рибосом у эукариот, архитектура процессинга общего для обеих субъединиц 90S предшественника и предшественника малой 40S субъединицы у высших эукариот претерпела значительные изменения, детали которых еще предстоит изучить.

Дальнейшее описание биогенеза большой 60S субъединицы будет представлено в следующей части обзора. ●

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-04-00796 А «Анализ белково-нуклеинового состава интермедиатов сборки рибосомных субчастиц в генетически модифицированных клетках человека».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ban N., Nissen P., Hansen J., Moore P.B., Steitz T.A. // *Science*. 2000. V. 289. № 5481. P. 905–920.
- Jenner L., Melnikov S., de Loubresse N.G., Ben-Shem A., Iskakova M., Urzhumtsev A., Meskauskas A., Dinman J., Yusupova G., Yusupov M. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2012. V. 22. № 6. P. 759–767.
- Klinge S., Voigts-Hoffmann F., Leibundgut M., Ban N. // *Trends Biochem. Sci.* 2012. V. 37. № 5. P. 189–198.
- Melnikov S., Ben-Shem A., Garreau De Loubresse N., Jenner L., Yusupova G., Yusupov M. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2012. V. 19. № 6. P. 560–567.
- Baßler J., Hurt E. // *Annu. Rev. Biochem.* 2019. V. 88. № 1. P. 281–306.
- Mullineux S.T., Lafontaine D.L.J. // *Biochimie*. 2012. V. 94. № 7. P. 1521–1532.
- Hadjiolov A.A., Nikolaev N. // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 1978. V. 31. P. 95–144.
- Misteli T. // *Sci. Am.* 2011. V. 304. № 2. P. 66–73.
- van Sluis M., McStay B. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2017. V. 46. P. 81–86.
- Mangan H., Gailín M., McStay B. // *FEBS J.* 2017. V. 284. № 23. P. 3977–3985.
- Henderson A.S., Warburton D., Atwood K.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1972. V. 69. № 11. P. 3394–3398.
- Németh A., Längst G. // *Trends Genet.* 2011. V. 27. № 4. P. 149–156.
- Correll C.C., Bartek J., Dundr M. // *Cells*. 2019. V. 8. № 8. P. 869.
- Wang F., Ying C., Shang G., Jiao M., Hongfang Z. // *Micron*. 2013. V. 49. P. 15–20.
- DiMario P.J. // *Int. Rev. Cytol.* 2004. V. 239. P. 99–178.
- Thiry M., Lafontaine D.L.J. // *Trends Cell Biol.* 2005. V. 15. № 4. P. 194–199.
- Montanaro L., Treré D., Derenzini M. // *Am. J. Pathol.* 2008. V. 173. № 2. P. 301–310.
- Olson M.O.J. *The Nucleolus*. New York, NY. Springer New York, 2011. 414 c.
- Dragon F., Compagnone-Post P.A., Mitchell B.M., Porwancher K.A., Wehner K.A., Wormsley S., Settlage R.E., Shabanowitz J., Osheim Y., Beyer A.L., et al. // *Nature*. 2002. V. 417. № 6892. P. 967–970.
- Grandi P., Rybin V., Baßler J., Petfalski E., Strauß D., Marzioch M., Schäfer T., Kuster B., Tschochner H., Tollervy D., et al. // *Mol. Cell*. 2002. V. 10. № 1. P. 105–115.
- Pöll G., Braun T., Jakovljevic J., Neueder A., Jakob S., Woolford J.L., Tschochner H., Milkereit P. // *PLoS One*. 2009. V. 4. № 12. P. 8249.
- Henras A.K., Plisson-Chastang C., O'Donohue M.F., Chakraborty A., Gleizes P.E. // *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*. 2015. V. 6. № 2. P. 225–242.
- Rabl J., Leibundgut M., Ataíde S.F., Haag A., Ban N. // *Science*. 2011. V. 331. № 6018. P. 730–736.
- Laptev I., Shvetsova E., Levitskii S., Serebryakova M., Rubtsova M., Bogdanov A., Kamenski P., Sergiev P., Dontsova O. // *RNA Biol.* 2020. V. 17. № 4. P. 441–450.
- Laptev I., Shvetsova E., Levitskii S., Serebryakova M., Rubtsova M., Zgoda V., Bogdanov A., Kamenski P., Sergiev P., Dontsova O. // *Nucleic Acids Res.* 2020. V. 48. № 14. P. 8022–8034.
- Frottin F., Schueder F., Tiwary S., Gupta R., Körner R., Schlichthaerle T., Cox J., Jungmann R., Hartl F.U., Hipp M.S.

- // Science. 2019. V. 365. № 6451. P. 342–347.
27. Andersen J.S., Lam Y.W., Leung A.K.L., Ong S.-E., Lyon C.E., Lamond A.I., Mann M. // *Nature*. 2005. V. 433. № 7021. P. 77–83.
 28. Boisvert F.-M., van Koningsbruggen S., Navascués J., Lamond A.I. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007. V. 8. № 7. P. 574–585.
 29. Moraleva A., Magoulas C., Polzikov M., Hacot S., Mertani H.C., Diaz J.-J., Zatssepina O. // *Cell Cycle*. 2017. V. 16. № 20. P. 1979–1991.
 30. Barandun J., Chaker-margot M., Hunziker M., Molloy K.R., Chait B.T., Klinge S. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2017. V. 24. № 11. P. 944–953.
 31. Coleman A.W. // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 11. P. 79122.
 32. Wang M., Anikin L., Pestov D.G. // *Nucleic Acids Res.* 2014. V. 42. № 17. P. 11180–11191.
 33. Grisendi S., Mecucci C., Falini B., Pandolfi P.P. // *Nat. Rev. Cancer*. 2006. V. 6. № 7. P. 493–505.
 34. Tomecki R., Sikorski P.J., Zakrzewska-Placzek M. // *FEBS Lett.* 2017. V. 591. № 13. P. 1801–1850.
 35. Woolford J.L., Baserga S.J. // *Genetics*. 2013. V. 195. № 3. P. 643–681.
 36. Allmang C., Tollervey D. // *J. Mol. Biol.* 1998. V. 278. № 1. P. 67–78.
 37. Lebaron S., Schneider C., van Nues R.W., Swiatkowska A., Walsh D., Böttcher B., Granneman S., Watkins N.J., Tollervey D. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2012. V. 19. № 8. P. 744–753.
 38. Bleichert F., Granneman S., Osheim Y.N., Beyer A.L., Baserga S.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. № 25. P. 9464–9469.
 39. Horn D.M., Mason S.L., Karbstein K. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. № 39. P. 34082–34087.
 40. Granneman S., Petfalski E., Tollervey D. // *EMBO J.* 2011. V. 30. № 19. P. 4006–4019.
 41. Osheim Y.N., French S.L., Keck K.M., Champion E.A., Spasov K., Dragon F., Baserga S.J., Beyer A.L. // *Mol. Cell*. 2004. V. 16. № 6. P. 943–954.
 42. Venema J., Tollervey D. // *Annu. Rev. Genet.* 1999. V. 33. P. 261–311.
 43. Klinge S., Woolford J.L. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2019. V. 20. № 2. P. 116–131.
 44. Koš M., Tollervey D. // *Mol. Cell*. 2010. V. 37. № 6. P. 809–820.
 45. Zhang L., Wu C., Cai G., Chen S., Ye K. // *Genes Dev.* 2016. V. 30. № 6. P. 718–732.
 46. Sharma S., Lafontaine D.L.J. // *Trends Biochem. Sci.* 2015. V. 40. № 10. P. 560–575.
 47. Natchiar S.K., Myasnikov A.G., Kratzat H., Hazemann I., Klaholz B.P. // *Nature*. 2017. V. 551. № 7681. P. 472–477.
 48. Kiss T., Fayet-Lebaron E., Jády B.E. // *Mol. Cell*. 2010. V. 37. № 5. P. 597–606.
 49. Watkins N.J., Bohnsack M.T. // *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*. 2012. V. 3. № 3. P. 397–414.
 50. Sharma S., Yang J., Watzinger P., Kötter P., Entian K.D. // *Nucleic Acids Res.* 2013. V. 41. № 19. P. 9062–9076.
 51. Sharma S., Langhendries J.L., Watzinger P., Kötter P., Entian K.D., Lafontaine D.L.J. // *Nucleic Acids Res.* 2015. V. 43. № 4. P. 2242–2258.
 52. Kornprobst M., Turk M., Kellner N., Cheng J., Flemming D., Koš-Braun I., Koš M., Thoms M., Berninghausen O., Beckmann R., et al. // *Cell*. 2016. V. 166. № 2. P. 380–393.
 53. Rodríguez-Galán O., García-Gómez J.J., De la Cruz J. // *Biochim. Biophys. Acta – Gene Regul. Mech.* 2013. V. 1829. № 8. P. 775–790.
 54. Martin R., Straub A.U., Doebele C., Bohnsack M.T. // *RNA Biol.* 2013. V. 10. № 1. P. 4–18.
 55. Kressler D., Hurt E., Bergler H., Baßler J. // *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Res.* 2012. V. 1823. № 1. P. 92–100.
 56. Schultz J., Maisel S., Gerlach D., Müller T., Wolf M. // *RNA*. 2005. V. 11. № 4. P. 361–364.
 57. Joseph N., Krauskopf E., Vera M.I., Michot B. // *Nucleic Acids Res.* 1999. V. 27. № 23. P. 4533–4540.
 58. Burlacu E., Lackmann F., Aguilar L.C., Belikov S., van Nues R., Trahan C., Hector R.D., Dominelli-Whiteley N., Cockroft S.L., Wieslander L., et al. // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. № 1. P. 714.
 59. Pillon M.C., Sobhany M., Borgnia M.J., Williams J.G., Stanley R.E., Baker D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2017. V. 114. № 28. P. 5530–5538.
 60. Fromm L., Falk S., Flemming D., Schuller J.M., Thoms M., Conti E., Hurt E. // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. № 1. P. 1–11.
 61. Wu S., Tutuncuoglu B., Yan K., Brown H., Zhang Y., Tan D., Gamalinda M., Yuan Y., Li Z., Jakovljevic J., et al. // *Nature*. 2016. V. 534. № 7605. P. 133–137.
 62. Sanghai Z.A., Miller L., Molloy K.R., Barandun J., Hunziker M., Chaker-Margot M., Wang J., Chait B.T., Klinge S. // *Nature*. 2018. V. 556. № 7699. P. 126–129.
 63. Kater L., Thoms M., Barrio-Garcia C., Cheng J., Ismail S., Ahmed Y.L., Bange G., Kressler D., Berninghausen O., Sinning I., et al. // *Cell*. 2017. V. 171. № 7. P. 1599–1610.
 64. van Nues R.W., Rientjes J.M.J., Morré S.A., Mollee E., Planta R.J., Venema J., Raué H.A. // *J. Mol. Biol.* 1995. V. 250. № 1. P. 24–36.
 65. van der Sande C.A.F.M., Kwa M., van Nues R.W., van Heerikhuizen H., Raué H.A., Planta R.J. // *J. Mol. Biol.* 1992. V. 223. № 4. P. 899–910.
 66. Gadal O., Strauss D., Petfalski E., Gleizes P.E., Gas N., Tollervey D., Hurt E. // *J. Cell Biol.* 2002. V. 157. № 6. P. 941–951.
 67. Adams C.C., Jakovljevic J., Roman J., Harnpicharnchai P., Woolford J.L. // *RNA*. 2002. V. 8. № 2. P. 150–165.
 68. Castle C.D., Sardana R., Dandekar V., Borgianini V., Johnson A.W., Denicourt C. // *Nucleic Acids Res.* 2013. V. 41. № 2. P. 1135–1150.
 69. Anantharaman V., Makarova K.S., Burroughs A.M., Koonin E.V., Aravind L. // *Biol. Direct*. 2013. V. 8. № 1. P. 8–15.
 70. Castle C.D., Cassimere E.K., Lee J., Denicourt C. // *Mol. Cell Biol.* 2010. V. 30. № 18. P. 4404–4414.
 71. Schillewaert S., Wacheul L., Lhomme F., Lafontaine D.L.J. // *Mol. Cell Biol.* 2012. V. 32. № 2. P. 430–444.
 72. Gasse L., Flemming D., Hurt E. // *Mol. Cell*. 2015. V. 60. № 5. P. 808–815.
 73. Wang M., Pestov D.G. // *Nucleic Acids Res.* 2011. V. 39. № 5. P. 1811–1822.
 74. Geerlings T.H., Vos J.C., Raue H.A. // *RNA*. 2000. V. 6. № 12. P. 1698–1703.
 75. Stevens A., Poole T.L. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. № 27. P. 16063–16069.
 76. Xiang S., Cooper-Morgan A., Jiao X., Kiledjian M., Manley J.L., Tong L. // *Nature*. 2009. V. 458. № 7239. P. 784–788.
 77. Pillon M.C., Lo Y.H., Stanley R.E. // *DNA Repair (Amst.)*. 2019. V. 9. № 81. P. 102653.
 78. Chlebowski A., Lubas M., Jensen T.H., Dziembowski A. // *Biochim. Biophys. Acta – Gene Regul. Mech.* 2013. V. 1829. № 6–7. P. 552–560.
 79. Januszyn K., Lima C.D. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2014. V. 24. № 1. P. 132–140.
 80. Lykke-Andersen S., Tomecki R., Jensen T.H., Dziembowski A. // *RNA Biol.* 2011. V. 8. № 1. P. 61–66.
 81. Liu Q., Greimann J.C., Lima C.D. // *Cell*. 2006. V. 127. № 6. P. 1223–1237.
 82. Zinder J.C., Lima C.D. // *Genes Dev.* 2017. V. 31. № 2. P. 88–100.

83. Schneider C., Leung E., Brown J., Tollervey D. // *Nucleic Acids Res.* 2009. V. 37. № 4. P. 1127–1140.
84. Lorentzen E., Conti E. // *Methods Enzymol.* 2008. V. 447. P. 417–435.
85. Wasmuth E.V., Januszky K., Lima C.D. // *Nature.* 2014. V. 511. № 7510. P. 435–439.
86. Cristodero M., Böttcher B., Diepholz M., Scheffzek K., Clayton C. // *Mol. Biochem. Parasitol.* 2008. V. 159. № 1. P. 24–29.
87. Dziembowski A., Lorentzen E., Conti E., Séraphin B. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2007. V. 14. № 1. P. 15–22.
88. Makino D.L., Schuch B., Stegmann E., Baumgärtner M., Basquin C., Conti E. // *Nature.* 2015. V. 524. № 7563. P. 54–58.
89. Thoms M., Thomson E., Baßler J., Griesel S., Hurt E. // *Cell.* 2015. V. 162. P. 1029–1038.
90. De la Cruz J., Kressler D., Tollervey D., Linder P. // *EMBO J.* 1998. V. 17. № 4. P. 1128–1140.
91. Allmang C., Kufel J., Chanfreau G., Mitchell P., Petfalski E., Tollervey D. // *EMBO J.* 1999. V. 18. № 19. P. 5399–5410.
92. Jia H., Wang X., Anderson J.T., Jankowsky E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. № 19. P. 7292–7297.
93. Allmang C., Petfalski E., Podtelejnikov A., Mann M., Tollervey D., Mitchell P. // *Genes Dev.* 1999. V. 13. № 16. P. 2148–2158.
94. Kummer E., Ban N. // *Biochemistry.* 2018. V. 57. № 32. P. 4765–4766.
95. Schuller J.M., Falk S., Fromm L., Hurt E., Conti E. // *Science.* 2018. V. 360. № 6385. P. 219–222.
96. Sloan K.E., Bohnsack M.T., Schneider C., Watkins N.J. // *RNA.* 2014. V. 20. № 4. P. 540–550.
97. Langhendries J.L., Nicolas E., Doumont G., Goldman S., Lafontaine D.L.J. // *Oncotarget.* 2016. V. 7. № 37. P. 59519–59534.
98. Hadjiolova K.V., Nicoloso M., Mazan S., Hadjiolova A.A., Bachellerie J.P. // *Eur. J. Biochem.* 1993. V. 212. № 1. P. 211–215.
99. Gerbi SA, Borovjagin AV. Pre-Ribosomal RNA Processing in Multicellular Organisms. *Madame Curie Bioscience Database.* Austin, TX: Landes Bioscience, 2000–2013.
100. Belin S., Beghin A., Solano-González E., Bezin L., Brunet-Manquat S., Textoris J., Prats A.C., Mertani H.C., Dumontet C., Diaz J.J. // *PLoS One.* 2009. V. 4. № 9. P. 7147.
101. Coleman A.W. // *Trends Genet.* 2015. V. 31. № 3. P. 157–163.
102. Sun Q., Zhu X., Qi J., An W., Lan P., Tan D., Chen R., Wang B., Zheng S., Zhang C., et al. // *eLife.* 2017. V. 6. e22086.
103. Cheng J., Kellner N., Berninghausen O., Hurt E., Beckmann R. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2017. V. 24. № 11. P. 954–964.
104. Dutca L.M., Gallagher J.E.G., Baserga S.J. // *Nucleic Acids Res.* 2011. V. 39. № 12. P. 5164–5180.
105. Puchta O., Cseke B., Czaja H., Tollervey D., Sanguinetti G., Kudla G. // *Science.* 2016. V. 352. № 6287. P. 840–844.
106. Beltrame M., Henry Y., Tollervey D. // *Nucleic Acids Res.* 1994. V. 22. № 20. P. 5139–5147.
107. Marmier-Gourrier N., Cléry A., Schlotter F., Senty-Ségault V., Branlant C. // *Nucleic Acids Res.* 2011. V. 39. № 22. P. 9731–9745.
108. Barandun J., Hunziker M., Klinge S. // *Curr. Opin Struct. Biol.* 2018. V. 49. P. 85–93.
109. Rout M.P., Field M.C. // *Annu. Rev. Biochem.* 2017. V. 86. P. 637–657.
110. Zhu J., Liu X., Anjos M., Correll C.C., Johnson A.W. // *Mol. Cell. Biol.* 2016. V. 36. № 6. P. 965–978.
111. Sardana R., Liu X., Granneman S., Zhu J., Gill M., Papoulas O., Marcotte E.M., Tollervey D., Correll C.C., Johnson A.W. // *PLoS Biol.* 2015. V. 13. № 2. e1002083.
112. Hierlmeier T., Merl J., Sauert M., Perez-Fernandez J., Schultz P., Bruckmann A., Hamperl S., Ohmayer U., Rachel R., Jacob A., et al. // *Nucleic Acids Res.* 2013. V. 41. № 2. P. 1191–1210.
113. De La Cruz J., Karbstein K., Woolford J.L. // *Annu. Rev. Biochem.* 2015. V. 84. P. 93–129.
114. Krogan N.J., Peng W.T., Cagney G., Robinson M.D., Haw R., Zhong G., Guo X., Zhang X., Canadien V., Richards D.P., et al. // *Mol. Cell.* 2004. V. 13. № 2. P. 225–239.
115. McCann K.L., Charette J.M., Vincent N.G., Baserga S.J. // *Genes Dev.* 2015. V. 29. № 8. P. 862–875.
116. Ferreira-Cerca S., Pöll G., Gleizes P.E., Tschochner H., Milkereit P. // *Mol. Cell.* 2005. V. 20. № 2. P. 263–275.
117. Shi Z., Fujii K., Kovary K.M., Genuth N.R., Röst H.L., Teruel M.N., Barna M. // *Mol. Cell.* 2017. V. 67. № 1. P. 71–83.
118. Chaker-Margot M., Hunziker M., Barandun J., Dill B.D., Klinge S. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2015. V. 22. № 11. P. 920–923.
119. Hunziker M., Barandun J., Petfalski E., Tan D., Delan-Forino C., Molloy K.R., Kim K.H., Dunn-Davies H., Shi Y., Chaker-Margot M., et al. // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. № 12090. P. 1–10.
120. Cheng J., Lau B., La Venuta G., Ameismeier M., Berninghausen O., Hurt E., Beckmann R. // *Science.* 2020. V. 369. № 6509. P. 1470–1476.
121. Hutten S., Kehlenbach R.H. // *Trends Cell Biol.* 2007. V. 17. № 4. P. 193–201.
122. Moriggi G., Nieto B., Dosil M. // *PLoS Genet.* 2014. V. 10. № 12. e1004836.
123. Nieto B., Gaspar S.G., Moriggi G., Pestov D.G., Bustelo X.R., Dosil M. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 1. P. 156.
124. Nerurkar P., Altvater M., Gerhardy S., Schütz S., Fischer U., Weirich C., Panse V.G. // *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 2015. V. 319. P. 107–140.
125. Strunk B.S., Loucks C.R., Su M., Vashisth H., Cheng S., Schilling J., Brooks C.L., Karbstein K., Skiniotis G. // *Science.* 2011. V. 333. № 6048. P. 1449–1453.
126. Larburu N., Montellese C., O'Donohue M.F., Kutay U., Gleizes P.E., Plisson-Chastang C. // *Nucleic Acids Res.* 2016. V. 44. № 17. P. 8465–8478.
127. Johnson M.C., Ghalei H., Doxtader K.A., Karbstein K., Stroupe M.E. // *Structure.* 2017. V. 25. № 2. P. 329–340.
128. Schäfer T., Maco B., Petfalski E., Tollervey D., Böttcher B., Aebi U., Hurt E. // *Nature.* 2006. V. 441. № 7093. P. 651–655.
129. Ghalei H., Schaub F.X., Doherty J.R., Noguchi Y., Roush W.R., Cleveland J.L., Elizabeth M., Karbstein K. // *J. Cell Biol.* 2015. V. 208. № 6. P. 745–759.
130. Mitterer V., Gantenbein N., Birner-Gruenberger R., Murat G., Bergler H., Kressler D., Pertschy B. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. № 1. P. 1–11.
131. Scaiola A., Peña C., Weisser M., Böhringer D., Leibundgut M., Klingauf-Nerurkar P., Gerhardy S., Panse V.G., Ban N. // *EMBO J.* 2018. V. 37. № 7. e98499.
132. Turowski T.W., Lebaron S., Zhang E., Peil L., Dudnakova T., Petfalski E., Granneman S., Rappsilber J., Tollervey D. // *Nucleic Acids Res.* 2014. V. 42. № 19. P. 12189–12199.
133. Strunk B.S., Novak M.N., Young C.L., Karbstein K. // *Cell.* 2012. V. 150. № 1. P. 111–121.
134. Ferreira-Cerca S., Kiburu I., Thomson E., Laronde N., Hurt E. // *Nucleic Acids Res.* 2014. V. 42. № 13. P. 8635–8647.
135. Belhabich-Baumas K., Joret C., Jády B.E., Plisson-Chastang C., Shayan R., Klopp C., Henras A.K., Henry Y., Mougain A. // *Nucleic Acids Res.* 2017. V. 45. № 18. P. 10824–10836.
136. Ghalei H., Trepreau J., Collins J.C., Bhaskaran H., Strunk B.S., Karbstein K. // *Mol. Cell.* 2017. V. 67. № 6. P. 990–1000.
137. Plassart L., Shayan R., Montellese C., Rinaldi D., Larburu N., Pichereaux C., Lebaron S., O'donohue M.-F., Kutay U., Marcoux J., et al. // *eLife.* 2021. V. 10. e61254.
138. Sleeman J.E. // *Philos. Trans. A. Math. Phys. Eng. Sci.* 2004. V. 362. № 1825. P. 2775–2793.

УДК 576.32/36:535.379

Хемилюминесценция в исследовании свободнорадикальных реакций.

Часть 2. Люминесцирующие добавки для увеличения квантового выхода хемилюминесценции

Л. А. Ромодин*

Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва, 123098 Россия

*E-mail: rla2904@mail.ru

Поступила в редакцию 18.03.2020

Принята к печати 11.06.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.11427

РЕФЕРАТ В настоящем обзоре рассмотрено применение метода регистрации хемилюминесценции, усиленной специальными люминофорами, для оценки течения свободнорадикальных процессов в модельных биологических системах. Проанализировано применение метода при использовании люминесцирующих добавок, усиливающих свечение за счет триплет-синглетного переноса энергии электронного возбуждения с продуктов радикальных реакций с последующим ее испусканием с высоким квантовым выходом в виде света и называемых активаторами, или усилителями хемилюминесценции. Приведены примеры этих веществ, описаны различия между так называемыми химическими и физическими усилителями, подробно рассмотрены производные кумарина как усилители хемилюминесценции, наиболее перспективные для изучения перекисного окисления липидов. Обозначены главные проблемы, связанные с использованием производных кумарина, и возможные пути решения этих проблем. Собственная хемилюминесценция и механизм возникновения свечения, сопровождающего реакции перекисаации биомолекул, были рассмотрены в первой части обзора.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА свободнорадикальные реакции, апоптоз, ферроптоз, хемилюминесценция, перекисное окисление липидов, активные формы кислорода, усилители хемилюминесценции, производные кумарина.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ДТМС – 7-(4,6-дихлор-1,3,5-триазирил-2-амино)-4-метилкумарин; С-314 – кумарин-314 – хинолизидин[5,6,7-*gh*]3-этоксикарбонилкумарин; С-334 – кумарин-334 – хинолизидин[5,6,7-*gh*]3-ацетилкумарин; С-525 – кумарин-525 – хинолизидин[5,6,7-*gh*]3,2'-бензимидазолилкумарин; ЭВС – электронные возбужденные состояния.

ВВЕДЕНИЕ

В силу крайне низкой интенсивности собственной хемилюминесценции, механизмы возникновения которой описаны в первой части обзора [1], ее регистрация крайне сложна. К тому же зачастую необходимо исследовать реакции с образованием и участием конкретных радикалов, к примеру, реакции перекисаации липидов, т.е. оценить наличие в исследуемой системе именно липидных радикалов, но метод регистрации собственной хемилюминесценции неспецифичен.

Для увеличения интенсивности хемилюминесценции применяют вещества, внесение которых в систему увеличивает интенсивность хемилюминесценции. Эти вещества называют активаторами хемилюминесценции (chemiluminescence enhancers, или activators). Определенную группу этих веществ

называют хемилюминесцентными зондами, однако и этот термин зачастую используется бессистемно. С химической точки зрения наиболее верными терминами были бы «хемилюминесцентный реагент», или «люминесцентная добавка». Неудачность термина «активатор» обусловлена тем, что в широком смысле этот термин трактуется как проявление способности того или иного соединения к химическим взаимодействиям, а в узком – как действующая часть концентрации. В монографии [2] приведен небольшой список терминов, относящихся к теме хемилюминесценции. В этом списке представлен термин «инициатор», под которым понимается «химически активное вещество, создающее первичные активные центры и тем увеличивающее скорость реакции, поставляющей активные продукты и изменяющей квантовый выход возбуждения». Под это

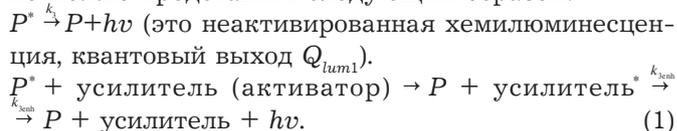
определение может подойти и термин «активатор». Отметим, что в биологических системах люминесцирующие добавки находятся в водной среде с рН около 7, где они могут иметь слабую растворимость, что ведет к агрегации. А взаимодействие фагоцитов с микрочастицами добавки активирует выработку активных форм кислорода [3, 4], поэтому термин «активатор» можно применить в данной системе по отношению к обсуждаемым добавкам.

Термин «активатор» допустимо использовать при описании систем с химически инициированной электронно-обменной люминесценцией, например, хемилюминесценцией эфиров оксалата [5]. В этом случае введение в систему флуорофора с низким потенциалом ионизации приводит к переносу электрона с этого соединения на интермедиат с последующим обратным переносом электрона, приводящим к возбуждению флуорофора, становящегося эмиттером хемилюминесценции. Однако чаще всего для обозначения люминесцирующей добавки используют именно термин «активатор», определяя это вещество как соединение, имеющее высокий квантовый выход излучения и усиливающее свечение за счет физической миграции энергии электронных возбужденных состояний (ЭВС), не изменяя квантовых выходов возбуждения продуктов радикальной реакции и ее скорость [2, 6, 7].

Усиление свечения в присутствии указанных веществ происходит в результате миграции энергии электронного возбуждения с продуктов реакции на добавку, которая (или продукт взаимодействия которой с продуктом радикальной реакции – донором возбуждения) является более эффективным эмиттером света, чем возбужденное вещество-донор. В 1963 году Р.Ф. Васильев исследовал механизм усиления хемилюминесценции при добавлении к находящимся в триплетном ЭВС кетоновым продуктам свободнорадикального окисления углеводородных субстратов производных антрацена [8]. Образующиеся возбужденные молекулы производных антрацена находились не в триплетном, а в синглетном ЭВС. Таким образом, был детально изучен процесс физического усиления хемилюминесценции в результате триплет-синглетного переноса энергии в жидкой фазе – фундаментальный фотофизический процесс, который широко используется для усиления свечения в хемилюминесцентных системах [8]. Заметим, что усиление хемилюминесценции в присутствии производных антрацена показано на год раньше [9], однако механизм этого усиления не был изучен. Анализ действия антрацена и его производных показал, что сам антрацен менее эффективен, нежели его галогензамещенные производные, особенно 9,10-дибромантрацен [9–11].

Рассчитанный для него «коэффициент запрета» триплет-синглетного перехода, равный отношению константы скорости этого процесса к константе скорости диффузии, составляет 10^{-2} [11].

Процесс усиления хемилюминесценции схематично можно представить следующим образом:



Это активированная хемилюминесценция, квантовый выход Q_{lum2} . При этом $Q_{lum1} \ll Q_{lum2}$.

Важной характеристикой усилителя хемилюминесценции является не только значение квантового выхода хемилюминесценции, но и его произведение на коэффициент молярной экстинкции данного вещества, так как именно это произведение прямо пропорционально яркости свечения [12].

Р.Ф. Васильев и В.Я. Беляков заложили основы использования триплет-триплетного и триплет-синглетного переноса энергии ЭВС для количественного исследования процессов хемилюминесценции [11]. В частности, раскрыта взаимосвязь между скоростями процессов миграции электронного возбуждения с продукта радикальной реакции – донора электронного возбуждения, концентрацией акцептора (обозначим ее буквой А) электронного возбуждения – усилителя хемилюминесценции, и интенсивностью хемилюминесценции в отсутствие акцептора возбуждения J_0 и в его присутствии J :

$$\frac{1}{\frac{J}{J_0} - 1} = \frac{1}{\frac{Q_{LumEnh} \cdot k_{TS}}{Q_{LumPr} \cdot (k_{TT} + k_{TS})} - 1} + \frac{1}{\frac{Q_{LumEnh} \cdot k_{TS}}{Q_{LumPr} \cdot (k_{TT} + k_{TS})} - 1} \cdot \frac{1}{(k_{TT} + k_{TS}) \cdot t_{ps} \cdot A}, \quad (2)$$

где Q_{LumEnh} – квантовый выход люминесценции усилителя – акцептора электронного возбуждения, Q_{LumPr} – квантовый выход возбужденного продукта радикальной реакции – донора электронного возбуждения, t_{ps} – среднее время жизни возбуждения донора в отсутствие акцептора, k_{TT} – константа скорости триплет-триплетного переноса энергии – тушения хемилюминесценции, k_{TS} – константа скорости триплет-синглетного переноса электронного возбуждения на молекулу акцептора. Константа скорости триплет-триплетного переноса, не ведущего к последующей люминесценции, выше, чем триплет-синглетного [11]. При разложении 1,2-диоксетанона неэмиссионный триплет-триплетный переход энергии присутствует в большей степени в сравнении с 1,2-диоксетаном, что определяет более низкую эф-

фективность эмиссии активированного разложения диоксетана по сравнению с диоксетаном [13].

Однако разные усилители хемилюминесценции имеют разные механизмы перехвата ЭВС у продуктов радикальных реакций. Имеются две группы усилителей хемилюминесценции. При этом необходимо указать на ряд проблем в их терминологии. Люминесцирующие добавки первой группы химически реагируют с участниками или продуктами свободнорадикальной реакции, переходя при этом в ЭВС, квантовый выход которого гораздо выше, нежели у собственной хемилюминесценции. По терминологии, предложенной А.И. Журавлевым [2], эти вещества названы «хемилюминесцентными зондами». Ю.А. Владимиров эти вещества называет также «химическими активаторами» хемилюминесценции [6]. С точки зрения химии, этим веществам больше подошел бы термин «хемилюминесцирующий реагент», так как они лишь заменяют реакционные маршруты активных форм кислорода, которые в естественных условиях ведут к сверхслабой хемилюминесценции, на другие пути, которые приводят к более сильной хемилюминесценции. Вещества из второй группы люминесцирующих добавок перехватывают ЭВС без химического взаимодействия с компонентами системы. Представители научной школы Ю.А. Владимирова [6, 14–16] называют эти вещества физическими активаторами хемилюминесценции, распространяя термин «активатор» на обе группы хемилюминесцирующих реагентов, в то время как авторы [2] термином «активатор» обозначают лишь строго физические активаторы хемилюминесценции.

Однако необходимо указать, что приведенная классификация во многом носит лишь теоретический характер: для большинства люминесцирующих добавок невозможно четко определить, к какой группе их следует относить. Это следствие того, что механизм хемилюминесценции большинства из них изучен недостаточно полно. А простое наблюдение увеличения интенсивности регистрируемой хемилюминесценции в ответ на введение той или иной добавки еще не позволяет отнести эту добавку ни к химическим, ни к физическим активаторам.

Отметим, что усилители хемилюминесценции были разделены на две группы в одной из первых работ, сделанной с их использованием [10]. В ней активаторы разделили на две группы – «плохие», не обладающие химической устойчивостью и тушащие люминесценцию при высоких концентрациях, и «хорошие», обладающие химической устойчивостью и коэффициентом усиления хемилюминесценции, монотонно растущим с увеличением концентрации (формулу расчета коэффициента усиления люминесценции см. в [10]).

НЕКОТОРЫЕ ПРИМЕРЫ ВЕЩЕСТВ, УСИЛИВАЮЩИХ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ

Впервые явление усиления хемилюминесценции наблюдали при использовании производных антрацена [8–10]. Впоследствии дибромантрацен, являющийся физическим усилителем хемилюминесценции, применяли, например, при изучении распада полимеров при их окислении перекисным соединением [17]; дибромантрацен и дифенилантрацен использовали при изучении хемилюминесценции мозга, индуцированной воздействием аскорбата и гемоглобина [18]. Антрацен использовали при изучении особенностей разложения диоксетанов и диоксетанов с генерацией ЭВС [13].

Наиболее часто в качестве хемилюминесцирующего реагента применяют люминол (5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндион) [19–28]. В первой половине XX века люминол был известен как вещество, способное к хемилюминесценции при окислении [29]. А в качестве активатора хемилюминесценции в биологической системе люминол впервые применили сотрудники группы под руководством Р. Эллана в 1972 году при изучении иммунной реакции полиморфно-ядерных лейкоцитов [30].

Механизм свечения, возникающего при окислении люминола, заключается в образовании 4-гидроперокси-1-окси-5-аминофталазин-4-олата – гидропероксидного продукта взаимодействия люминола с активными формами кислорода [31], хлораминами в сочетании с пероксидом водорода [32] или окисленными формами пероксида на определенных стадиях пероксидазного каталитического цикла [6]. Это соединение далее самопроизвольно превращается в 2,3-перокси-ди[гидрокси-метиленил]-фениламин, содержащий эндопероксидную группировку, которая в конечном счете разрывается, что приводит к образованию иона гидроаминофталата в ЭВС. Этот ион, переходя в основное состояние, испускает фотон (подробно механизм взаимодействия люминола с различными веществами см. в [6, 31, 33, 34]). Наряду с люминолом иногда применяют изолюминол, который активирует свечение посредством сходного механизма [35–37].

Люминол используется в методе определения общей антиоксидантной активности, в основе которого лежит его реакция с 2,2'-азо-бис(2-амидинпропаном) [38, 39], и в различных хемилюминесцентных методах обнаружения пероксида водорода (см. обзор [40]). В некоторых методиках в качестве хемилюминесцирующих реагентов предполагается использовать одновременно несколько веществ. Так, добавление в систему флуоресцеина повышает интенсивность хемилюминесценции в присутствии люминола [41]. Описано также увеличение интенсивности свечения

[42] при добавлении с систему пероксидаза хрена– H_2O_2 –люминол некоторых фенолов. Однако некоторые фенолы, так называемые non-enhancer phenol, подавляют хемиллюминесценцию в системе пероксидаза хрена– H_2O_2 –люминол–4-йодфенол [43]. В качестве субстратов люминола эти фенолы конкурируют между собой, но не с 4-йодфенолом. Люминол до сих пор наиболее часто применяется при определении иммунореактивности лейкоцитов [37, 44, 45], его используют и в исследовании липопероксидазных реакций [24]. Широкое применение люминола обусловлено большим квантовым выходом его люминесценции, однако усиленная люминолом хемиллюминесценция неспецифична, поэтому, используя люминол, невозможно точно определить, какие именно свободнорадикальные реакции и в каких соотношениях протекают в исследуемом образце.

Существуют и более специфичные хемиллюминесцирующие реагенты, например люциферин–люциферазная система [46] (помимо люциферина люцифераза может иметь и другие субстраты [46]), применяемая для обнаружения молекул АТФ [47], что может использоваться для решения большого количества задач.

Другой специфический химический хемиллюминесцирующий реагент – целентеразин (2-(4-гидроксibenзил)-6-(4-гидрофенол)-8-бензил-3,7-дигидроимидазо[1,2-альфа]пирозин-3-он), с помощью которого определяют содержание супероксидного радикала $O_2^{\cdot -}$.

Один из реагентов, наиболее часто применяемых для детекции супероксидного радикала, – люцигенин [6, 48]. Его, к примеру, можно использовать для изучения окисления ксантина или гипоксантина ксантиноксидазой [49] с целью обнаружения супероксидного радикала, образующегося в ходе работы NADPH-оксидаз [49–52], а также в митохондриях интактных клеток [53] или же в суспензии выделенных митохондрий [54, 55]. В последнее время разработаны методики, в которых люцигенин используется для обнаружения дофамина [56] и глутатиона [57]. В обоих случаях люцигенин входит в состав относительно сложной тест-системы (гипотетические механизмы активации люцигенинзависимой хемиллюминесценции в различных системах подробно рассмотрены в обзоре [6]).

В качестве хемиллюминесцирующего реагента используют также флуоресцеин, обладающий высоким квантовым выходом триплетного возбуждения [58], например, в одной из методик индикации пероксида водорода [40].

Используя в качестве хемиллюминесцирующего реагента бромистый этидий, изучали дезаминирование аминокислот при их окислении H_2O_2 в при-

сутствии Fe^{2+} [59]. Установлено, что в системах, использованных в этой работе, рост концентрации бромистого этидия до 100 мкМ сопровождался увеличением интенсивности люминесценции, которая снижалась при более высоких концентрациях бромистого этидия. Причем бромистый этидий в концентрации 1 мМ в значительной степени замедлял окисление аминокислот.

Хемиллюминесцентные зонды, несмотря на то, что они зачастую вызывают большее усиление свечения, поскольку сами участвуют в процессах, происходящих в изучаемой системе, не пригодны для проведения фундаментальных исследований, к которым относится и изучение процессов пероксидации липидов. В этом случае желательно использовать физические усилители хемиллюминесценции, обеспечивающие увеличение квантового выхода свечения за счет резонансного переноса энергии ЭВС продуктов реакции без химического взаимодействия с участниками и продуктами этой реакции [60–62]. Подобный подход в полной мере соответствует принципу невмешательства в исследуемую систему.

На рис. 1 представлены формулы некоторых веществ, используемых в качестве люминесцирующих реагентов, в ряде исследований.

ПОИСК ФИЗИЧЕСКИХ УСИЛИТЕЛЕЙ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ, СОПРОВОЖДАЮЩЕЙ РЕАКЦИИ ПЕРОКСИДАЦИИ ЛИПИДОВ

Взаимодействие хемиллюминесцентного зонда с компонентами изучаемой системы представляет большую проблему для их использования в фундаментальных исследованиях, так как при этом анализируется хемиллюминесцентный сигнал не от системы, допустим, липидный субстрат–пероксидаза–пероксид водорода, а от системы липидный субстрат–пероксидаза–пероксид водорода–активатор хемиллюминесценции. Такие данные нельзя считать в полной мере адекватными для переноса их на живые организмы.

Большой вклад в исследование усилителей хемиллюминесценции, специфичных для свободнорадикальных процессов с участием липидов, внес В.С. Шаров. В 1980-х годах была изучена возможность использования различных лантаноидов для усиления хемиллюминесценции. Выдвинуто предположение, что в основе этого процесса лежит межмолекулярный перенос энергии от продуктов, образующихся в ходе свободнорадикальных реакций пероксидов, на 4f-оболочку иона лантаноида [63]. В качестве примера можно привести данные [64], которые позволили сделать вывод о возможности использования ионов тербия Tb^{3+} в качестве физического усилителя хемиллюминесценции

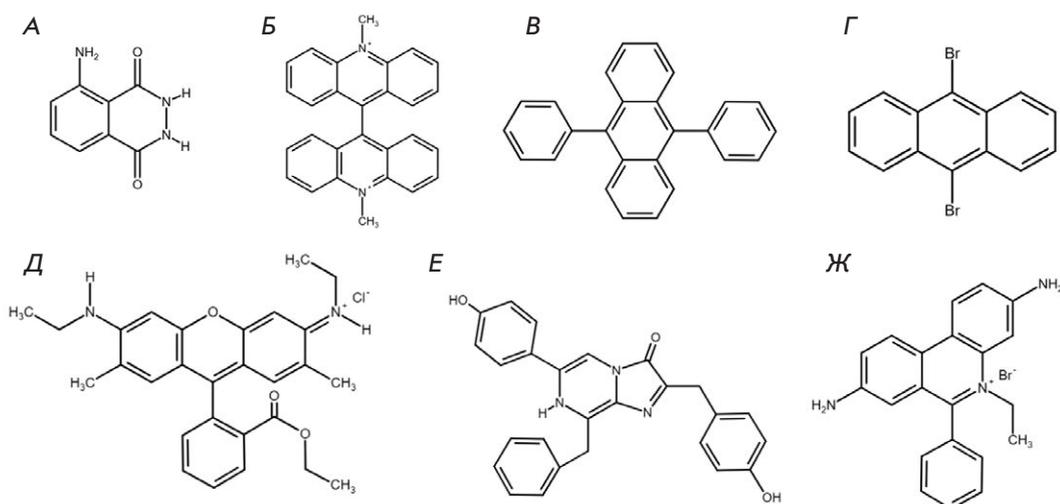


Рис. 1. Формулы некоторых веществ, используемых в качестве химических усилителей (активаторов) хемилюминесценции: люминол (А), люцигенин (Б), 9,10-дифенилантрацен (В), 9,10-дибромантрацен (Г), родамин 6G (Д), целентеразин (Е), бромистый этидий (Ж)

при изучении процессов пероксидации липидов. Несколько раньше показали, что комплекс европия с тетрациклином увеличивает интенсивность хемилюминесценции при перекисном окислении липидов [65]. Однако для проведения исследований в биологических системах ионы лантаноидов не подходят в силу следующих обстоятельств. Еще в 1980-х годах обнаружили затухание хемилюминесценции при использовании ионов лантаноидов в модельных биологических системах. Объяснили это тем, что ионы лантаноидов могут легко образовывать комплексные соединения с веществами буферной среды, в результате чего зачастую пропадает их способность усиливать хемилюминесценцию [65].

Кроме того, изучение механизма возникновения хемилюминесценции, усиленной комплексом Eu^{3+} с 2,2-диметил-6,6,7,7,8,8,8-гептафтор-3,5-октандионом в присутствии диметилдиоксирана (модельного органического пероксида), показало, что комплекс лантаноида химически взаимодействует с этим органическим пероксидом. А данные ЯМР-исследования смеси после реакции и фотофизические характеристики выделенного продукта реакции отличались от свойств исходного хелата европия. Сходные результаты получены и для комплексов Eu^{3+} с 2-теноилтрифторацетоном, 2,2,6,6-тетраметил-3,5-гептандионом (дипивалоилметаном) и трис[3-(трифторметилгидроксиметил)-*d*-камфоратом], причем в случае комплекса с трис[3-(трифторметилгидроксиметил)-*d*-камфоратом] в условиях избытка диметилдиоксирана наблюдалась хемилюминесценция, не свойственная иону Eu^{3+} , а обусловленная неизвестным эмиттером [66].

По-видимому, хемилюминесценция хелатов лантаноидов может быть обусловлена их взаимодействием с органическими пероксидами [67]. Этот вывод подтверждается предположением о ключевой роли диоксиранового интермедиата в развитии

хемилюминесценции при твердофазной реакции пероксимоносульфата калия и гексагидрата нитрата европия в присутствии паров ацетона, хотя непосредственным эмиттером является ион Eu^{3+} [66, 67]. Также стоит сказать, что в реакциях распада органических пероксидов активаторами хемилюминесценции, сходными с ионами Eu^{3+} , являются ионы неодима Nd^{3+} и иттербия Yb^{3+} [66].

Однако необходимо указать, что химическим активатором [66, 67] называют именно комплекс ионов лантаноидов, а не сами ионы, которые испускают фотоны, перехватывая ЭВС с хелатирующего агента.

Таким образом, при поиске оптимального усилителя хемилюминесценции нужно использовать вещества, в молекулах которых с высокой долей вероятности смогут происходить триплет-синглетные переходы. Обусловлено это тем, что продукты, образующиеся при диспропорционировании липопероксидных радикалов, находятся в триплетном ЭВС [11]. Описанные выше комплексы лантаноидов, несмотря на указанные недостатки, удовлетворяют этому требованию. Также данному требованию соответствуют и низкомолекулярные органические вещества, содержащие сопряженные циклические группировки. В качестве примера можно привести гистологический краситель нильский синий, используемый в качестве усилителя хемилюминесценции, сопровождающей окисление липидов, индуцированное ионами Fe^{2+} [68].

При исследовании закономерностей разложения тетраоксанов под действием неорганических солей Fe^{2+} в качестве физического активатора хемилюминесценции с большим квантовым выходом использовали родамин 6G – вещество ксантенового ряда (как доказательство приведено совпадение кинетических зависимостей активированной и собственной хемилюминесценции изучаемой системы) [69]. Сходными свойствами обладают производные кумарина. Специфическими для реакций пероксидации

липидов усилителями хемиллюминесценции являются хинолизидиновые производные кумарина, известные как кумарин-314 (С-314), кумарин-334 (С-334) и кумарин-525 (С-525) [16, 60–62, 70]. В силу селективного усиления хемиллюминесценции, вызванной свободно-радикальными реакциями с участием липидов, именно эти вещества наиболее целесообразно использовать при изучении процессов перекисидации липидов.

Производные кумарина и их применение для регистрации хемиллюминесценции

Кумарины – это группа органических соединений, включающая ненасыщенные ароматические лактоны – производные 5,6-бензо- α -пирона (кумарина, или 5,6-бензо-пиран-2-она) – лактона *цис*-орто-оксикоричной кислоты [71]. Многие представители этой группы веществ используются как лазерные красители [72]. Эффективными флуорофорами с эмиссией в видимой области спектра являются производные кумарина, имеющие заместитель в 7-й позиции (в качестве примера приведены 7-гидрокси-4-метилкумарин и 7-амино-4-метилкумарин) [12].

Привлекают внимание работы, в которых производные кумарина служат индикаторами или частью индикаторной системы. Структурные формулы производных кумарина, применяемых в качестве усилителей хемиллюминесценции, приведены на рис. 2. Одно из производных кумарина, получаемое реакцией конденсации нитрометана и кумаринилового альдегида, показало способность к избирательному специфичному обнаружению анионов цианида [73]. В результате реакции нуклеофильного ароматического замещения цианидом водорода в молекуле кумарина происходит изменение цвета и усиление интенсивности флуоресценции (длина волны возбуждения равна 365 нм) в такой степени, что ее можно наблюдать даже невооруженным глазом. Предел обнаружения составил менее 3 мкМ цианида (в среде ацетонитрила): кумариновая группировка обеспечивает появление ярко-синего флуоресцентного сигнала. Также в качестве хромогенных и флуоресцентных хемосенсоров для обнаружения цианид-аниона и катионов Cu^{2+} можно привести 6,7-дигидрокси-4-метил-8-формилкумарин и 3,4-бензо-7-гидрокси-8-формилкумарин [74]. ДТМС – 7-(4,6-дихлор-1,3,5-триазилил-2-амино)-4-метилкумарин, предложен для определения содержания пероксида водорода хемиллюминесцентным методом [75]. Предел обнаружения пероксида водорода составляет 4×10^{-8} моль/л. Но стоит обратить внимание на высокие значения рН среды (11.4), используемые в этом методе.

Для обнаружения формальдегида было предложено использовать 1-диэтиламинобензо[4,3-*e*]-пиран-2-гидразон (PFM) [76]. Через год был пред-

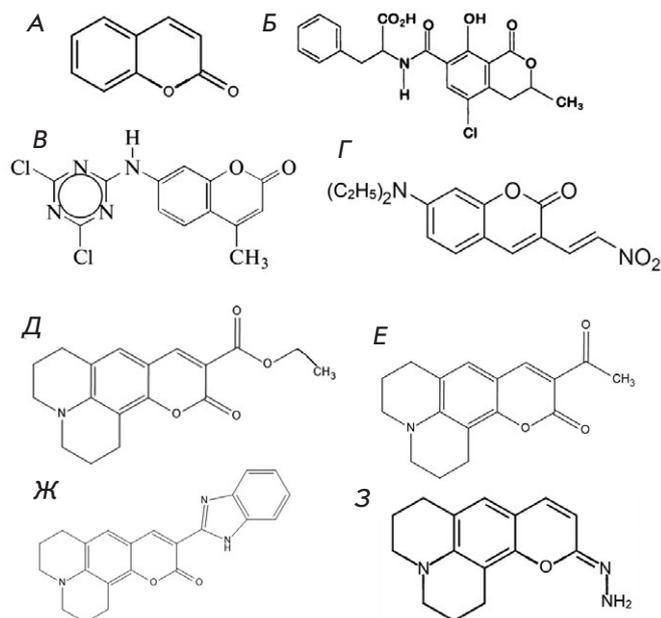


Рис. 2. Кумарин (А) и некоторые его производные: охратоксин А (Б), ДТМС (В), 3-(2-нитровинил), 7-диэтиламино-кумарин (Г), С-314 (Д), С-334 (Е), С-525 (Ж), PFM4 (З)

ставлен более эффективный люминофор, названный PFM4 (рис. 2, 3) [77]. С его помощью успешно оценено накопление формальдегида в лизосомах клеток, обработанных индукторами стресса эндоплазматического ретикулума [77].

В исследовании, проведенном в 1995 году, изучено влияние различных усилителей на интенсивность хемиллюминесценции, сопровождающей индуцированное ионами железа перекисное окисление фосфолипидов в составе липосом, полученных из яичного желтка. Наибольший эффект показал С-525 (2,3,5,6-1Н,4Н-тетрагидро-9-(2'-бензимидазоллил)-хинолизин-(9,9а,1-ГН)), который в концентрации 4 мкМ более чем в 2000 раз увеличивал интенсивность хемиллюминесценции, не влияя при этом на ее кинетику [62]. Механизм усиления свечения в данном случае – это, судя по всему, перенос энергии с молекулы кетона, находящейся в ЭВС (первичного продукта рекомбинации пероксильных радикалов), на флуоресцентный уровень С-525 [60]. При этом нельзя не учесть, что С-525 содержит пуриновую группу, взаимодействие которой со свободными радикалами в определенных условиях приводит к проявлению антиоксидантных свойств у этого вещества [78]. Подобный недостаток имеется и у 2-метил-6-[*p*-метоксифенил]-3,7-дигидроимидазо[1,2-*a*]пиразин-3-она [79] – специфического активатора хемиллюминесценции супероксидного радикала [80].

Однако, несмотря на подобную структуру, С-525 достаточно часто используют в качестве активатора

хемилюминесценции, например, с целью определения гидропероксидов липидов в системе липидный субстрат– Fe^{2+} [16]. На схожей системе с использованием С-334 показано, что хемилюминесценция системы, содержащей комплекс цитохрома с с кардиолинином, обусловлена именно липопероксидазной и квазилипоксигеназной активностью этой наночастицы, а не негемовым железом посредством реакции Фентона [81].

Изучению ЭВС производных кумарина также следует уделить внимание. Определение фотогенерирования радикалов катиона С-314 с использованием наносекундного возбуждения лазером при длинах волн более 400 нм в бензоле, ацетонитриле и дихлорметане позволило обнаружить триплетное ЭВС С-314 с максимальным поглощением на длине волны 550 нм и временем жизни 90 мкс в бензоле, которое легко гасится кислородом [82]. В водной среде возбужденное состояние не обнаружено, но зато идентифицирован относительно долгоживущий (160 мкс в растворах с уравновешенным воздухом) катионный свободный радикал С-314 с максимумом поглощения на длине волны 370 нм. Кроме того, показано тушение этих катионных свободных радикалов С-314 фенольными антиоксидантами; константа скорости этой реакции оказалась больше $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [82]. Согласно [82], эта реакция протекает по механизму переноса электронов между фенольным антиоксидантом и катион-радикалом С-314, причем возможно и образование ионных пар.

Изучение растворения С-314 в водной среде с добавлением поверхностно-активного вещества [83] выявило наличие двух хорошо дифференцированных межфазных сред (вода/воздух). Автором настоящего обзора показано, что С-314, С-334 и С-525 в концентрациях выше 50 мкМ в воде не растворяются, при этом оптимальным диапазоном концентраций производного кумарина в системе является 20–25 мкМ. Согласно [83] добавление поверхностно-активного вещества способствовало сольватации С-314. При этом выявлено два различных положения молекул С-314 относительно пространственных доменов поверхностно-активного вещества в результате больших флуктуаций концентрации поверхностно-активных веществ, которые имеют место при небольшой «зоне покрытия», обычно называемой «пространством двумерного газожидкостного сосуществования» [83].

С помощью хемилюминесценции, активированной С-525, изучены механизмы действия различных антиоксидантов: β -каротина, токоферола, рутина и аскорбата – подавления ими перекисного окисления липидов, запускаемого свободными ионами двухвалентного железа [84]. При использовании метода усиленной С-525 хемилюминесценции были из-

учены физико-химические свойства липопротеинов низкой плотности плазмы крови. Показано повышение амплитуды быстрой вспышки люминесценции для окисленных липопротеинов в среде, содержащей катионы Fe^{2+} [61]. Методом регистрации хемилюминесценции, усиленной С-525, изучено свободнорадикальное окисление кардиолипина в составе его комплекса с цитохромом с [70].

Интересны результаты сравнения кумарина С-525 как усилителя хемилюминесценции с хлорофиллом- α [72]. Квантовый выход свечения при использовании С-525 оказался гораздо выше. Наблюдалось усиление на 2–3 порядка хемилюминесценции, сопровождающей индуцированное трет-бутилгидропероксидом окисление микросом из печени крысы и перекисное окисление липосомных липидов. Отмечается, что производные кумарина активируют хемилюминесценцию за счет переноса энергии от карбониллов, находящихся в триплетном ЭВС, образующихся в реакции пероксидного радикала через механизм Расселла или при разложении диоксетана.

Необходимо отметить весьма существенный недостаток хинолизиновых производных кумарина: С-525 теряет способность к люминесценции в сыворотке крови [55]. Предполагается, что это обусловлено связыванием С-525 с сывороточными альбуминами.

Неоднократно сообщалось, что С-314, С-334 и С-525 являются люминофорами, не реагирующими с компонентами исследуемой смеси [16, 60–62, 70]. И хотя данный вывод получен в системе, в которой шла неферментативная пероксидация липидов [62], он по умолчанию переносится и на системы, в которых этот процесс запускается пероксидазой, несмотря на то, что В.С. Шаров и соавт. еще в 1996 году сообщили, что С-525 не подходит для изучения пероксидации липидов, катализируемой пероксидазой хрена, в силу его нестабильности в этой системе [72].

Данные о том, что хинолизиновые производные кумарина служат субстратами пероксидазной реакции, подтверждены в работах [85, 86], в которых показано статистически значимое снижение концентрации С-314, С-334 и С-525 в ходе пероксидазной реакции, катализируемой комплексом цитохрома с с кардиолипином. Снижение концентрации кумариновых производных в процессе ферментативной липидной пероксидации приводит к снижению интенсивности хемилюминесценции, что может привести к ошибочной интерпретации данных: исследователь может сделать ложный вывод о снижении интенсивности процесса перекисного окисления липидов. В случае изучения, к примеру, антиоксидантов, такая ложная трактовка приведет к ошибочному суждению об эффективности подавления исследуемым

веществом липидной пероксидации. Чтобы этого избежать при проведении опыта по измерению хемиллюминесценции, сопровождающей липидную пероксидацию и усиленной производными кумарина, нужно умножать зарегистрированные хемиллюминетром значения ее интенсивности на поправочные на снижение концентрации производных кумарина коэффициенты для соответствующих моментов времени от начала реакции. Эти коэффициенты следует вычислять, используя математическую функцию, обратную убывающей функции доли концентрации производных кумарина от времени реакции.

При этом следует также убедиться, что реакция между производным кумарина и пероксидазой не сопровождается люминесценцией. В противном случае в функцию вычисления поправочных коэффициентов необходимо также добавлять дополнительные коэффициенты, нивелирующие вклад в зарегистрированные прибором значения люминесценции свечения, обусловленного реакцией усилителя хемиллюминесценции с пероксидазой, не имеющих отношения к свечению, сопровождающему перекисное окисление липидов.

При корректировке при помощи обсуждаемых поправочных функций зарегистрированных прибором хемиллюминесцентных кривых их можно будет приводить в такой вид, который бы они имели в случае постоянства концентрации усилителя хемиллюминесценции в системе. Следовательно, станет возможной адекватная оценка процессов ферментативного перекисного окисления липидов, имеющих место в исследуемой пробе. ●

Автор настоящего обзора благодарит Н.П. Лысенко, профессора кафедры радиобиологии и биофизики имени академика А.Д. Белова ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина, за помощь в подготовке англоязычной версии статьи и заведующего кафедрой медицинской биофизики факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова академика РАН Ю.А. Владимирову за консультации по вопросам механизмов активации хемиллюминесценции и рекомендации по анализу научной литературы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Romodina L.A. // Acta Naturae. 2021. V. 13. № 3(50). P. 90–100.
- Журавлев А.И., Зубкова С.М. Антиоксиданты. Свободнорадикальная патология, старение. М.: Белье альвы, 2014. 304 с.
- Piryazev A.P., Azizova O.A., Aseichev A.V., Dudnik L.B., Sergienko V.I. // Bull. Exp. Biol. Med. 2013. V. 156. № 1. P. 101–103.
- Meier B., Radeke H.H., Selle S., Habermehl G.G., Resch K., Sies H. // Biol. Chem. Hoppe-Seyler. 1990. V. 371. № 10. P. 1021–1025.
- Bryan P.D., Capomacchia A.C. // J. Pharm. Biomed. Analysis. 1991. V. 9. № 10–12. P. 855–860.
- Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В. // Успехи биол. химии. 2009. Т. 49. С. 341–388.
- Байматов В.Н., Фархутдинов Р.Р., Багаутдинов А.М. Хемиллюминесцентные методы исследования свободнорадикального окисления в сельском хозяйстве, ветеринарной медицине и животноводстве. Уфа: «Здравоохранение Башкортостана», 2009. 104 с.
- Vassil'ev R.F. // Nature. 1963. V. 200. № 4908. P. 773–774.
- Vassil'ev R.F. // Nature. 1962. V. 196. № 4855. P. 668–669.
- Васильев Р.Ф., Вичутинский А.А., Черкасов А.С. // ДАН СССР. 1963. Т. 149. № 1. С. 124–127.
- Belyakov V.A., Vassil'ev R.F. // Photochem. Photobiol. 1970. V. 11. № 3. P. 179–192.
- Мартынов В.И., Пахомов А.А., Попова Н.В., Деев И.Е., Петренко А.Г. // Acta Naturae. 2016. Т. 8. № 4(31). С. 37–51.
- Augusto F.A., Frances-Monerris A., Fdez Galvan I., Roca-Sanjuan D., Bastos E.L., Baader W.J., Lindh R. // Physical Chemistry Chemical Physics: PCCP. 2017. V. 19. № 5. P. 3955–3962.
- Владимиров Ю.А., Потапенко А.Я. Физико-химические основы фотобиологических процессов: учебное пособие для медицинских и биологических спец. вузов. Москва: Высшая школа, 1989. 199 с.
- Vladimirov Yu.A., Proskurnina E.V., Izmajlov D.Yu. // Bull. Exp. Biol. Med. 2007. V. 144. № 3. P. 390–396
- Волкова П.О., Алексеев А.В., Джатдоева А.А., Проскурнина Е.В., Владимиров Ю.А. // Вест. МГУ. Сер. 2: Химия. 2016. Т. 57. № 1. С. 41–52.
- Phillips D., Anissimov V., Karpukhin O., Shlyapintokh V. // Photochem. Photobiol. 1969. V. 9. № 2. P. 183–187.
- Prat A.G., Turrens J.F. // Free Radical Biol. Med. 1990. V. 8. № 4. P. 319–325.
- Zhao C., Cui H., Duan J., Zhang S., Lv J. // Analyt. Chem. 2018. V. 90. № 3. P. 2201–2209.
- Zhang A., Guo W., Ke H., Zhang X., Zhang H., Huang C., Yang D., Jia N., Cui D. // Biosensors Bioelectronics. 2018. V. 101. P. 219–226.
- Saqib M., Qi L., Hui P., Nsabimana A., Halawa M.I., Zhang W., Xu G. // Biosensors Bioelectronics. 2018. V. 99. P. 519–524.
- Mayer M., Takegami S., Neumeier M., Rink S., Jacobi von Wangelin A., Schulte S., Vollmer M., Griesbeck A.G., Duerkop A., Baeumner A.J. // Angewandte Chemie. 2018. V. 57. № 2. P. 408–411.
- Li F., Ma W., Liu J., Wu X., Wang Y., He J. // Analyt. Bioanal. Chem. 2018. V. 410. № 2. P. 543–552.
- Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., Демин Е.М., Матвеева Н.С., Любичкий О.Б., Новиков А.А., Измайлов Д.Ю., Осипов А.Н., Тихонов В.П., Каган В.Е. // Биохимия. 2009. Т. 74. № 3. С. 372–379.
- Демин Е.М., Проскурнина Е.В., Владимиров Ю.А. // Вест. МГУ. Сер. 2: Химия. 2008. Т. 49. № 5. С. 354–360.
- Mostafa I.M., Halawa M.I., Chen Y., Abdussalam A., Guan Y., Xu G. // Analyst. 2020. V. 145. № 7. P. 2709–2715.
- Хабибуллин Р.Р., Федосов А.В. // Баш. хим. журн. 2006. Т. 13. Вып. 2. С. 106–107.
- Zhang X., Zhang H., Xu S., Sun Y. // Analyst. 2014. V. 139.

- № 1. P. 133–137.
29. Huntress E., Stanley L., Parker A. // *J. Am. Chem. Soc.* 1934. V. 56. № 1. P. 241–242.
30. Allen R.C., Stjernholm R.L., Steele R.H. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1972. V. 47. № 4. P. 679–684.
31. Рошупкин Д.И., Белакина Н.С., Мурина М.А. // *Биофизика*. 2006. Т. 51. № 1. С. 99–107.
32. Мурина М.А., Белакина Н.С., Рошупкин Д.И. // *Биофизика*. 2004. Т. 49. № 6. С. 1099–1105.
33. Arnhold J., Mueller S., Arnold K., Sonntag K. // *J. Biolumin. Chemilumin.* 1993. V. 8. № 6. P. 307–313.
34. Mueller S., Arnhold J. // *J. Biolumin. Chemilumin.* 1995. V. 10. № 4. P. 229–237.
35. Проскурнина Е.В., Джатдоева А.А., Лобиченко Е.Н., Шалина Р.И., Владимиров Ю.А. // *Журн. аналит. химии*. 2017. Т. 72. № 7. С. 639–644.
36. Ji X., Wang W., Li X., Chen Y., Ding C. // *Talanta*. 2016. V. 150. P. 666–670.
37. Dahlgren C., Bjornsdottir H., Sundqvist M., Christenson K., Bylund J. // *Meth. Mol. Biol.* 2020. V. 2087. P. 301–324.
38. Селиверстова Е.Ю., Сазыкин И.С., Хмелевцова Л.Е., Майоров Е.Л. // *Валеология*. 2014. № 4. С. 26–34.
39. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., Измайлов Д.Ю. // *Биофизика*. 2011. Т. 56. № 6. С. 1081–1090.
40. Цаплев Ю.Б. // *Журн. аналит. химии*. 2012. Т. 67. № 6. С. 564–572.
41. Navas Diaz A., Gonzalez Garcia J.A., Lovillo J. // *J. Biolumin. Chemilumin.* 1997. V. 12. № 4. P. 199–205.
42. Hodgson M., Jones P. // *J. Biolumin. Chemilumin.* 1989. V. 3. № 1. P. 21–25.
43. Candy T.E., Jones P. // *J. Biolumin. Chemilumin.* 1991. V. 6. № 4. P. 239–243.
44. Torabi R., Ghourchian H. // *Sci. Repts.* 2020. V. 10. № 1. P. 594.
45. Chen M.S., Lu P.K., Lin W.C., Shin H.C., Sie S.R., Sheu S.M. // *Lipids*. 2020. V. 55. № 1. P. 45–52.
46. Lee J., Muller F., Visser A. // *Photochem. Photobiol.* 2019. V. 95. № 3. P. 679–704.
47. Dubyak G.R. // *Meth. Enzymol.* 2019. V. 629. P. 81–102.
48. Greenlee L., Fridovich I., Handler P. // *Biochemistry*. 1962. V. 1. P. 779–783.
49. Storch J., Ferber E. // *Analyt. Biochem.* 1988. V. 169. № 2. P. 262–267.
50. Bhunia A.K., Han H., Snowden A., Chatterjee S. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. № 25. P. 15642–15649.
51. Irani K., Xia Y., Zweier J.L., Sollott S.J., Der C.J., Fearon E.R., Sundaresan M., Finkel T., Goldschmidt-Clermont P.J. // *Science*. 1997. V. 275. № 5306. P. 1649–1652.
52. Allen R.C. // *Meth. Enzymol.* 1986. V. 133. P. 449–493.
53. Rembish S.J., Trush M.A. // *Free Rad. Biol. Med.* 1994. V. 17. № 2. P. 117–126.
54. Джатдоева А.А., Полимова А.М., Проскурнина Е.В., Владимиров Ю.А. // *Вест. Рос. гос. мед. ун-та*. 2016. № 1. С. 54–60.
55. Матвеева Н.С. Активированная хемилюминесценция как метод изучения свободнорадикальных реакций в клетках и тканях: Дис. ... канд. биол. наук. М.: МГУ, 2012. 204 с.
56. Lan Y., Yuan F., Fereja T.H., Wang C., Lou B., Li J., Xu G. // *Analyt. Chem.* 2019. V. 91. № 3. P. 2135–2139.
57. Halawa M.I., Wu F., Zafar M.N., Mostafa I.M., Abdussalam A., Han S., Xu G. // *J. Materials Chem. B*. 2019. V. 8(16). P. 3542–3549.
58. Demissie A.A., Dickson R.M. // *J. Phys. Chem. A*. 2020. V. 124. № 7. P. 1437–1443.
59. Воейков В.Л., Баскаков И.В. // *Биофизика*. 1995. Т. 40. № 6. С. 1150–1157.
60. Sharov V.S., Dremina E.S., Vladimirov Iu.A. // *Biofizika*. 1995. V. 40. № 2. P. 428–433.
61. Vladimirov Iu.A., Sherstnev M.P., Azimbaev T.K. // *Biofizika*. 1995. V. 40. № 2. P. 323–327.
62. Vladimirov Y.A., Sharov V.S., Driomina E.S., Reznitchenko A.V., Gashev S.B. // *Free Rad. Biol. Med.* 1995. V. 18. № 4. P. 739–745.
63. Шаров В.С., Владимиров Ю.А. // *Биофизика*. 1982. Т. 27. С. 327–329.
64. Шаров В.С., Владимиров Ю.А. // *Биофизика*. 1984. Т. 29. № 3. С. 394–397.
65. Шаров В.С., Суслова Т.Б., Деев А.И., Владимиров Ю.А. // *Биофизика*. 1980. Т. 25. С. 923–924.
66. Сафаров Ф.Э. Хемилюминесценция комплексов лантаноидов в реакциях с органическими пероксидами. Автореф. дис. ... канд. хим. наук. Уфа, 2011.
67. Казаков Д.В., Казаков В.П., Сафаров Ф.Э., Остахов С.С., Ахмадеева Г.Х. // *Баш. хим. журн.* 2007. Т. 14. № 1. С. 69–70.
68. Шерстнев М.П., Азимбаев Т.К., Владимиров Ю.А. // *Биофизика*. 1995. № 40. С. 531–535.
69. Галимов Д.И., Назыров Т.И., Бидалова С.Р., Газеева Д.Р., Булгаков Р.Г. // *Вестн. Баш. ун-та*. 2015. Т. 20. Вып. 3. С. 841–844.
70. Владимиров Ю.А., Демин Е.М., Проскурнина Е.В., Осипов А.Н. // *Биол. мембраны*. 2009. Т. 26. № 6. С. 493–504.
71. Выделение и анализ природных биологически активных веществ. Томск: изд-во Томского ун-та, 1987. 184 с.
72. Sharov V.S., Briviba K., Sies H. // *Free Rad. Biol. Med.* 1996. V. 21. № 6. P. 833–843.
73. Kim G.J., Kim H.J. // *Tetrahedron Lett.* 2010. V. 51. № 10. P. 185–187.
74. Николаева О.Г., Ревинский Ю.В., Тихомирова К.С., Дмитриева О.И., Дубоносов А.Д., Брень В.А. // *Наука Юга России*. 2018. Т. 14. № 2. С. 14–19.
75. Ma Q., Ma H., Wang Z., Su M., Xiao H., Liang S. // *Talanta*. 2001. V. 53. № 5. P. 983–990.
76. Liang X.G., Chen B., Shao L.X., Cheng J., Huang M.Z., Chen Y., Hu Y.Z., Han Y.F., Han F., Li X. // *Theranostics*. 2017. V. 7. № 8. P. 2305–2313.
77. Liang X.G., Cheng J., Qin S., Shao L.X., Huang M.Z., Wang G., Han Y., Han F., Li X. // *Chem. Commun.* 2018. V. 54. № 85. P. 12010–12013.
78. Jiang J., Bakan A., Kapralov A.A., Silva K.I., Huang Z., Amoscato A.A., Peterson J., Garapati V.K., Saxena S., Bayir H., et al. // *Free Rad. Biol. Med.* 2014. V. 71. P. 221–230.
79. Tampo Y., Tsukamoto M., Yonaha M. // *FEBS Lett.* 1998. V. 430. № 3. P. 348–352.
80. Imada I., Sato E.F., Miyamoto M., Ichimori Y., Minamiyama Y., Konaka R., Inoue M. // *Analyt. Biochem.* 1999. V. 271. № 1. P. 53–58.
81. Ромодин Л.А., Владимиров Ю.А., Лысенко Н.П., Зарудная Е.Н. // *Изв. Межд. акад. аграрного образования*. 2018. № 42. Т. 1. С. 102–106.
82. Aspee A., Alarcon E., Pino E., Gorelsky S.I., Scaiano J.C. // *J. Phys. Chem. A*. 2012. V. 116. № 1. P. 199–206.
83. Pantano D.A., Sonoda M.T., Skaf M.S., Laria D. // *J. Phys. Chem. B*. 2005. V. 109. № 15. P. 7365–7372.
84. Vasiljeva O.V., Lyubitsky O.B., Klebanov G.I., Vladimirov Yu.A. // *Membr. Cell Biol.* 1998. V. 12. № 2. P. 223–231.
85. Ромодин Л.А., Шангин С.В., Владимиров Ю.А., Лысенко Н.П., Храмов А.П. // *Изв. Межд. акад. аграрного образования*. 2018. № 42. Т. 1. С. 118–123.
86. Ромодин Л.А., Владимиров Ю.А., Шангин С.В., Владимиров Г.К., Лысенко Н.П., Демихов Е.И. // *Биофизика*. 2020. Т. 65. № 4. С. 680–690.

УДК 571.27

Иммуногенная гибель опухолевых клеток в терапии онкологических заболеваний

О. С. Троицкая^{1*}, Д. Д. Новак^{1,2}, В. А. Рихтер¹, О. А. Коваль^{1,2}¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, 630090 Россия²Новосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия

E-mail: troitskaya_olga@bk.ru

Поступила в редакцию 16.07.2021

Принята к печати 20.12.2021

DOI: 10.32607/actanaturae.11523

РЕФЕРАТ Апоптоз играет важную роль в гибели клеток, вызванной химиопрепаратами. Устоявшееся мнение о том, что апоптоз должен быть иммунологически инертен и, следовательно, может оставаться незамеченным для иммунной системы, в последнее время было пересмотрено и было введено понятие иммуногенной клеточной гибели (immunogenic cell death, или ICD). В обзоре рассмотрены основные признаки и особенности индукции иммуногенной клеточной гибели, имеющей большое значение для эффективности терапии онкологических заболеваний и фундаментального исследования регуляции процессов клеточной гибели. Подробно описан механизм «вакцинирующего эффекта» гибнущих по пути ICD опухолевых клеток, что при повторной встрече с опухолевыми клетками данного типа будет активировать специфический противоопухолевый ответ. Подробно рассмотрена роль основных молекулярных событий, позволяющих говорить об иммуногенном типе клеточной гибели, таких, как экспозиция кальретикулина и белка теплового шока HSP70 на внешнюю поверхность цитоплазматической мембраны клетки, а также выход ядерного белка HMGB1 и ATP в межклеточное пространство. Систематизированы данные об индукторах иммуногенной клеточной гибели: химиопрепаратах, цитотоксических белках, онколитических вирусах, а также о физических методах индукции ICD.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА иммуногенная клеточная гибель (ICD), HMGB1, кальретикулин, противоопухолевая вакцинация, химиопрепараты, апоптоз-индуцирующие белки, онколитические вирусы, холодная плазма. **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** АПК – антигенпрезентирующие клетки; АФК – активные формы кислорода; ВОВ – вирус осповакцины; ХПС – холодная плазменная струя; ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты; ЭПР – эндоплазматический ретикулум; CRT – кальретикулин; DAMP – молекулярные сигналы опасности; HMG – белки группы высокой подвижности; HSP – белок теплового шока; ICD – иммуногенная клеточная гибель; IL – интерлейкин; LPC – лизофосфатидилхолин; МНС – главный комплекс гистосовместимости; PS – фосфатидилсерин; TLR – Toll-подобные рецепторы; TNF – фактор некроза опухоли.

ВВЕДЕНИЕ

Устоявшееся мнение о том, что для успешного уничтожения опухолевых клеток предпочтительна гибель по пути апоптоза без активации иммунной системы, в последнее время было пересмотрено. Одной из успешных противоопухолевых стратегий, отличных от хирургического вмешательства, является стратегия «двойного действия», когда, с одной стороны, противоопухолевый препарат напрямую индуцирует гибель большинства раковых клеток, а с другой стороны, погибающие клетки активируют иммунную систему, формируя специфический иммунный ответ на опухолевые антигены, что ведет к уничтожению оставшихся опухолевых кле-

ток. Таким требованиям удовлетворяют индукторы иммуногенной клеточной гибели (immunogenic cell death, ICD), к которым относятся противоопухолевые препараты и подходы с различными механизмами действия: традиционные химиопрепараты, белковые агенты, онколитические вирусы, методы фотодинамической и радиотерапии, а также холодная плазма. Иммуногенную клеточную гибель можно определить по активации определенной комбинации молекулярных сигналов опасности (DAMPs) от погибающих опухолевых клеток, что способствует их узнаванию и поглощению антигенпрезентирующими клетками. Основными молекулярными событиями, позволяющими говорить об индукции

ICD, считаются экспозиция кальретикулина и белка теплового шока HSP70 на внешнюю поверхность цитоплазматической мембраны клетки, а также выход ядерного белка HMGB1 и АТФ в межклеточное пространство [1, 2]. Процессинг и презентация опухолевых антигенов дендритными клетками запускают активацию антиген-специфических Т-лимфоцитов, что ведет к появлению адаптивного иммунного ответа против таких антигенов [3]. Активация иммуногенной клеточной гибели опухолевых клеток способствует формированию адаптивного иммунного ответа. Клетки, погибающие по пути ICD, при трансплантации сингенным иммунокомпетентным животным оказывают противоопухолевый вакцинирующий эффект [4]. Развитие специфического иммунного ответа в отношении антигенов погибающих опухолевых клеток позволяет использовать терапевтические индукторы ICD как для борьбы с метастазирующими опухолями, так и для разработки подходов к противоопухолевой иммунизации [5].

ИММУНОГЕННАЯ КЛЕТочНАЯ ГИБЕЛЬ. ОБЩИЕ ПОНЯТИЯ

Концепция иммунотерапии опухолей базируется на способности иммунной системы распознавать трансформированные клетки и воздействовать на их рост и распространение. Физиологическая гибель клеток происходит по пути апоптоза, который может быть активирован в результате реализации внутренних программ роста и жизнедеятельности организма или при внешнем воздействии [6]. Морфологическими признаками, позволяющими говорить о гибели клетки по типу апоптоза, являются конденсация хроматина, фрагментация ядра при интактной плазматической мембране и появление апоптотических телец, в то время как при некрозе наблюдается нарушение целостности плазматической мембраны, в результате чего происходит выход DAMPs, активирующих иммунную систему и запускающих реакцию воспаления [7]. К наиболее изученным DAMPs относятся белки HMGB1, MRP8, кальгранулин А, кальгранулин В и MRP14.

Различия в эффективности противоопухолевого действия оксалиплатина и доксорубицина, наблюдаемые в экспериментах на иммунодефицитных и обычных мышах-опухоленосителях, стали стимулом к поиску объяснения этого феномена. Шеффер и соавт. предположили, что при противоопухолевой вакцинации животных погибающими опухолевыми клетками репертуар антигенов погибающих и интактных клеток может отличаться [8]. Иммунокомпетентным мышам были трансплантированы опухолевые клетки, в одних

из которых γ -облучением был индуцирован апоптоз, а в других – последовательными процедурами замораживания/оттаивания индуцирован некроз. Показано, что при последующей трансплантации живых клеток опухоли этим же мышам только у животных, вакцинированных апоптотическими клетками, не происходило развития опухоли в 75–100% случаев. Тогда как лишь у 0–30% животных, вакцинированных некротическими клетками по той же схеме, трансплантация живых опухолевых клеток не приводила к развитию опухоли. Иммуногистохимический анализ места вакцинации апоптотическими клетками показал инфильтрацию этой области CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитами и дендритными клетками, что указывает на сильный Т-клеточный ответ, в то время как сайт вакцинации некротическими клетками был преимущественно инфильтрирован лишь макрофагами [8]. Таким образом, выявлен иммуногенный потенциал клеток, в которых γ -облучением был индуцирован апоптоз. Показано, что трансплантированные мышам опухолевые клетки, в которых апоптоз индуцирован производными антрациклинов, например доксорубицином, стимулируют созревание дендритных клеток с последующим формированием иммунного ответа против опухолевых клеток *in vivo* [4]. Сравнение противоопухолевого эффекта лечения оксалиплатином или сердечными гликозидами иммунокомпетентных и иммунодефицитных мышей-опухоленосителей выявило элиминацию опухолевых клеток у иммунокомпетентных мышей, что доказывало роль иммунной системы в противоопухолевом действии этих препаратов [9, 10]. Апоптоз, вызывающий описанные эффекты, назван иммуногенным апоптозом. Поиск молекулярных маркеров иммуногенного апоптоза показал, что для него характерна секреция DAMPs, узнаваемых дендритными клетками, с дальнейшим процессингом и презентацией антигенов от погибающих клеток. Это приводит к активации специфических Т-лимфоцитов и формированию долгосрочного противоопухолевого иммунитета [5].

МЕХАНИЗМ ИНДУКЦИИ ИММУНОГЕННОЙ КЛЕТочНОЙ ГИБЕЛИ

Роль эндоплазматического ретикулума в индукции ICD

Доксорубицин, митоксантрон и γ -облучение стали первыми известными эффективными индукторами иммуногенной клеточной гибели. Оказалось, что способность этих противоопухолевых препаратов вызывать ICD зависит от их способности индуцировать стресс эндоплазматического ретикулума (ЭПР) [11]. Основопологающим этапом в индукции

иммуногенной клеточной гибели является экспозиция шаперонов ЭПР, прежде всего кальретикулина (CRT), на внешнюю плазматическую мембрану. При воздействии определенных стимулов клетка может запускать интегрированный стрессовый ответ – комплексный молекулярный механизм, направленный на сохранение клеточного гомеостаза [12]. В частности, стресс ЭПР, вызванный антрациклинами, стимулирует киназу PERK, которая фосфорилирует фактор инициации трансляции eIF2 α [13]. Инактивация eIF2 α сопровождается частичной активацией каспазы 8 и расщеплением белка, ассоциированного с В-клеточными рецепторами 31 (BAP31), и конформационной активацией белков Вах и Вак, что в свою очередь запускает транслокацию шаперонов ЭПР на внешнюю мембрану клетки [11]. Для большинства индукторов ICD процесс транслокации шаперонов на внешнюю мембрану происходит не напрямую, а в результате транспорта из ЭПР в аппарат Гольджи, опосредованного везикуло-ассоциированным мембранным белком 1 (VAMP1) и белком, ассоциированным с синапсоматомы 25 (SNAP25), а также требует сопутствующей продукции активных форм кислорода (АФК) [11, 14, 15]. Согласно [16], если заблокировать транспорт из ЭПР в аппарат Гольджи, то при воздействии индукторов ICD происходит снижение секреции АТР во внеклеточное пространство, но не приводит к экспозиции CRT, что говорит в пользу того, что, прежде чем достичь плазматической мембраны, кальретикулин и АТР используют путь транспорта из ЭПР в аппарат Гольджи. Следует отметить, что вызванная ICD транслокация CRT на внешнюю клеточную мембрану, по-видимому, регулируется множеством факторов: хемокиновым лигандом CXCL8 [17], изменением уровня ионов Ca²⁺ в ЭПР [18], а также каспазой 2 [19], длинными некодирующими РНК (например, ncRNA-RB1 и miR-27a) [20] и интегринными плазматической мембраны, по крайней мере, в некоторых условиях [21]. CRT и другие шапероны ЭПР на поверхности клетки способствуют поглощению таких погибающих клеток или их частей, и их относят к сигналам «съешь меня» для антигенпрезентирующих клеток (АПК) [16]. Более того, экспозиция CRT, по-видимому, стимулирует секрецию IFN 1 антигенпрезентирующими клетками [22], что также может способствовать иммуногенности регулируемой клеточной гибели.

Показано, что одновременное увеличение уровня АФК в клетке и индукция стресса ЭПР активируют сигнальные пути, которые помогают транспортировать DAMPs во внеклеточное пространство [11, 23]. Интересно, что иммуногенность снижалась в присутствии антиоксидантов, что говорит в пользу

решающего значения АФК для индукции ICD [11, 24]. Позже установили, что цисплатин, который вызывает изменения в окислительно-восстановительном метаболизме клетки, не может запускать ICD из-за своей неспособности вызывать стресс ЭПР [25]. Более того, одновременный стресс ЭПР и продукция АФК увеличивали количество различных выпускаемых DAMPs, что в конечном итоге становится решающим для иммуногенности погибающих опухолевых клеток [16, 26]. Например, этопозид вызывает только экспозицию HSP70 и секрецию АТР, но не индуцирует стресс ЭПР и не способен вызывать ICD [23, 27, 28].

Классификация ICD

Выделяют два типа индукторов ICD в зависимости от того, вызывают они апоптоз в результате воздействия на ЭПР или апоптотическая гибель клеток и стресс ЭПР происходят независимо друг от друга [29]. Такие агенты, как доксорубин или митоксантрон, могут быть классифицированы как индукторы ICD типа I, т.е. агенты, которые вызывают апоптотическую гибель клеток, действуя через мишени, не связанные с ЭПР, и которые стимулируют ассоциированную с ICD иммуногенность посредством вторичных или «побочных» стрессовых эффектов ЭПР. Напротив, индукторы ICD типа II избирательно нацелены на мишени в ЭПР и могут индуцировать иммуногенный апоптоз, напрямую изменяя гомеостаз ЭПР и вызывая его стресс, как, например, фотодинамическая терапия. Таким образом, стресс ЭПР, индуцированный индукторами ICD типа I, может качественно отличаться от стресса, вызванного индукторами типа II, поскольку он может быть более мягким и способен инициировать передачу сигналов, способствующих выживанию [29].

Помимо иммуногенного апоптоза, среди видов программируемой клеточной гибели выделяют аутофагию, некроптоз и пироптоз с активацией некоторых маркеров ICD. В *табл. 1* представлены варианты иммуногенной гибели клеток и их специфические особенности.

Каскад иммуногенной гибели клеток

На сегодняшний день определены основные молекулярные события, необходимые для реализации иммуногенной клеточной гибели (*рис. 1*). Первым этапом каскада ICD является экспозиция на поверхности погибающих опухолевых клеток комплекса из двух белков – кальретикулина и дисульфид-изомеразы ERp57 [11]. Оба белка в норме локализованы в полости ЭПР и транслоцируются на поверхность клетки в течение нескольких часов после стимуляции индукторами ICD. Экспозиция

Таблица 1. Сравнение различных типов программируемой клеточной гибели при проявлении иммуногенности

Тип клеточной гибели	DAMPs, характерные для ICD	Сигналы «съешь меня»	Воспаление	Иммуногенность	Терминальные клеточные события
Апоптоз	Экто-CRT, секреция HMGB1 и ATP	Экто-CRT, HSP70, HSP90, экспозиция PS	-	+	Нелитический путь, фрагментация ДНК и апоптотические тельца
Аутофагия	Выход HMGB1 и ATP	Секреция LPC, экспозиция PS	-	+	Нелитический путь, аутофагальные тельца
Некроптоз	Длинные геномные ДНК, IL-6 [30], ATP, HMGB1 [31]	Секреция LPC, экспозиция PS, низкий уровень экто-CRT [31]	+	++	Нелитический путь, потеря целостности плазматической мембраны, набухшие клеточные органеллы
Пироптоз	Выход HMGB1, ATP, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-18, TNF- α	Экспозиция PS	+	++	Литический путь, разрыв клеточной мембраны, выход содержимого из клетки

Примечание. Степень иммуногенности для каждого типа гибели клеток оценивали как + и ++ в соответствии с уровнями выраженности сигналов «съешь меня» и эмиссией DAMPs [30].

CRT детектируется до транслокации фосфатидилсерина (PS) на внешней мембране гибнущей клетки. Транслокация CRT из ЭПР является иницирующим сигналом «съешь меня» для фагоцитирующих клеток. Экспонированный на мембране клетки кальретикулин взаимодействует с рецепторами CD91 на поверхности дендритных клеток, что стимулирует поглощение погибающих клеток [29, 32].

Следующий молекулярный признак ICD, который можно наблюдать после экспозиции CRT – транслокация из ядра на клеточную поверхность белков теплового шока, таких, как HSP70 или HSP90, которые подобно кальретикулину могут связываться с рецептором CD91 на поверхности дендритных клеток, что стимулирует их активацию и созревание [33].

Спустя 12–18 ч после начала экспозиции CRT в межклеточное пространство выходит негистоновый хроматинсвязывающий ядерный белок HMGB1. Этот белок связывается с рецепторами TLR4 дендритных клеток, что необходимо для оптимального TLR4-зависимого процессинга и презентации Т-клеткам опухолевых антигенов дендритными клетками [34]. Во время химиотерапии или лучевой терапии дендритные клетки получают сигнал через TLR4 и его адаптор MyD88 для эффективной обработки и перекрестной презентации антигена от гибнущих опухолевых клеток [35]. Заключительное молекулярное событие в каскаде ICD – выход ATP во внеклеточное пространство – сигнала «найди меня» и необходимого для продуктивного созревания дендритных клеток. Погибающие клетки обозначают свое присутствие с помощью хемотаксических факторов, известных как сигналы «найди меня», необходимых для того, чтобы фагоцитирующие клетки (нейтрофилы, моноциты, тканевые ма-

крофаги) быстро находили их и эффективно уничтожали [36]. Выход ATP из гибнущих клеток в межклеточное пространство активирует пуриnergические рецепторы P2X7 на дендритных клетках и вызывает P2X7/NLRP3 рецепторзависимую активацию инфламмосомы в дендритных клетках, тем самым содействуя протеолитическому созреванию и высвобождению провоспалительных цитокинов, таких, как интерлейкин IL-1 β . IL-1 β необходим для активации антиген-специфических CD8⁺ Т-лимфоцитов, продуцирующих IFN γ [3]. Именно IL-1 β участвует в активации факторов врожденного иммунитета, развитии воспаления и первых этапах иммунного ответа [34, 37].

При успешной реализации каскада иммуногенного апоптоза должна появиться популяция антиген-специфических Т-клеток, которые при повторной встрече с опухолевыми клетками данного типа будут узнавать соответствующие антигены и уничтожать раковые клетки (рис. 2). Возможность индукции каскада иммуногенного апоптоза в опухолевых клетках противоопухолевыми препаратами позволила разработать стратегию противоопухолевой вакцинации, при которой «вакциной» являются клетки, в которых индуцирована иммуногенная клеточная гибель.

ЭНДОГЕННЫЕ ФАКТОРЫ, ЗАДЕЙСТВОВАННЫЕ В РЕАЛИЗАЦИИ ИММУНОГЕННОЙ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ

Кальретикулин (CRT)

Приблизительно 30% всех клеточных белков и пептидов синтезируются в ЭПР, где они взаимодействуют с ферментами и шаперонами, включая кальре-

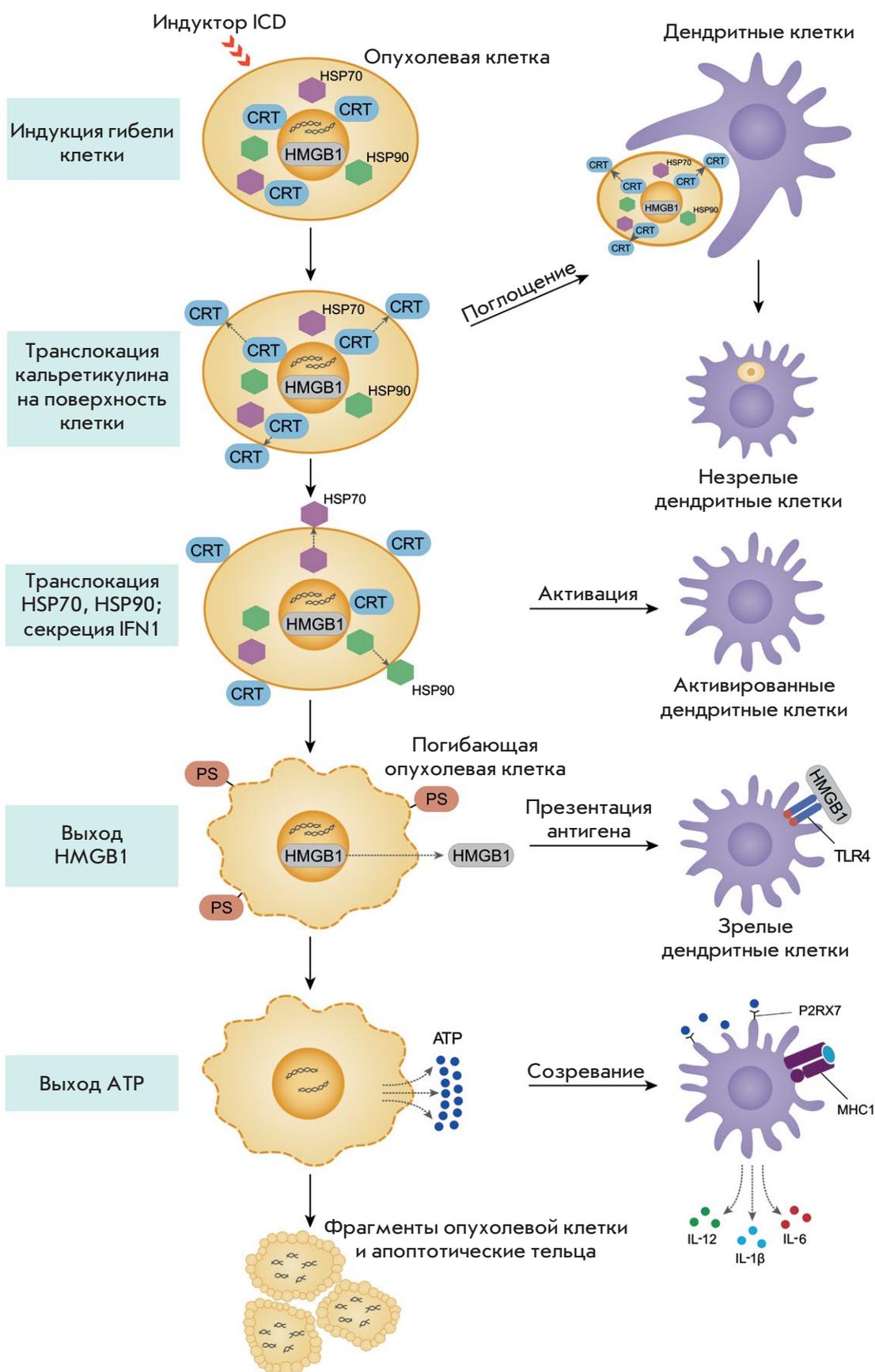


Рис. 1. Последовательные стадии иммуногенного апоптоза с активацией антигенпредставляющих дендритных клеток

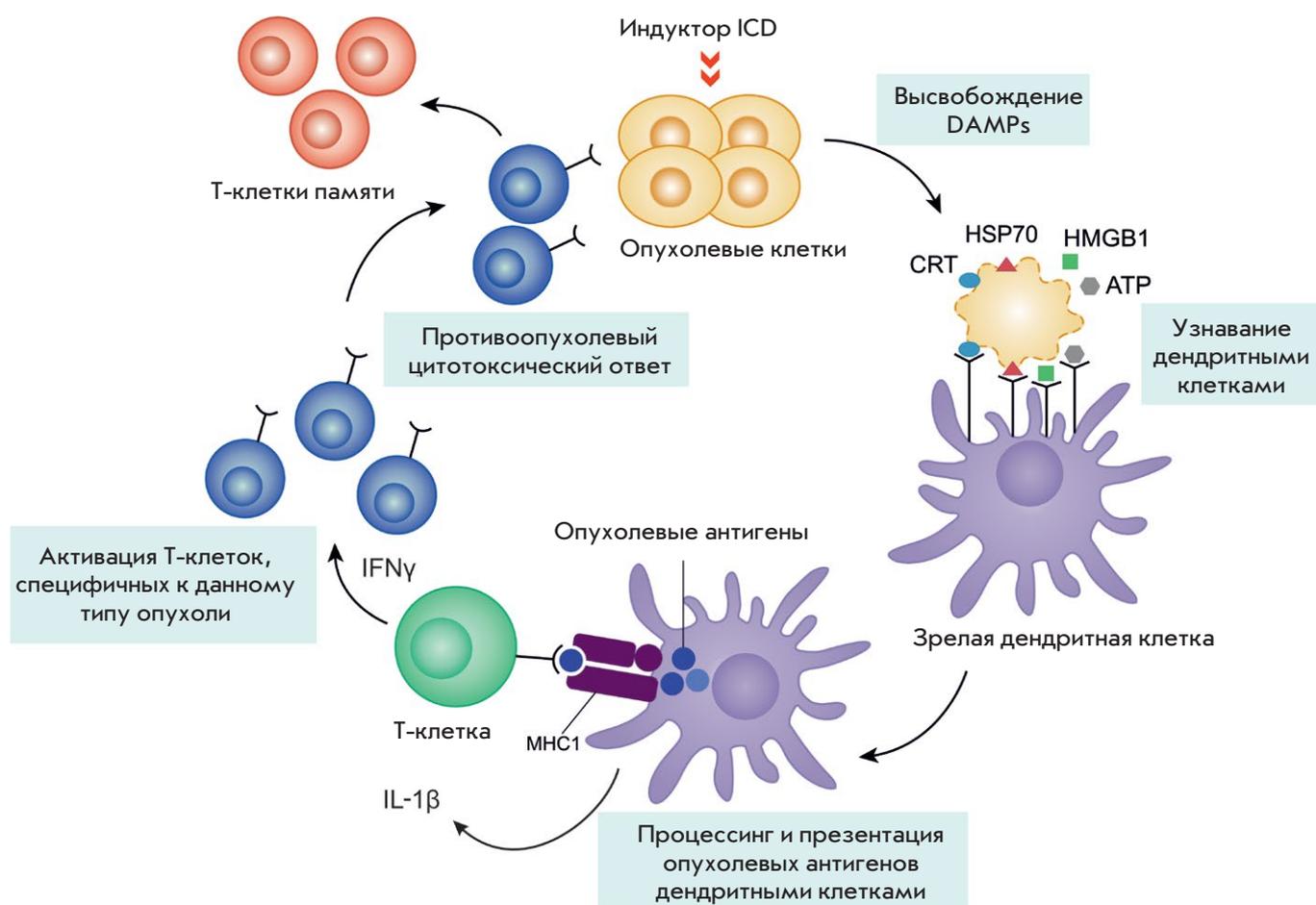


Рис. 2. Упрощенная схема индукции иммуногенной клеточной гибели

тикулин, кальнексин, глюкозо-регулируемый белок Grp94, тиоловые оксидоредуктазы PDI и дисульфид-изомеразу ERp57. Все эти молекулы участвуют в формировании функциональной конформации белковых молекул [38]. CRT, кальнексин и ERp57 составляют шаперонный комплекс, осуществляющий фолдинг и контроль качества синтезированных белков, которые транспортируются через ЭПР.

Другая важная функция ЭПР – хранение и высвобождение ионов Ca^{2+} [39]. Одним из таких белков является кальретикулин – уникальный Ca^{2+} -связывающий шаперон [40]. В клетках с пониженной экспрессией CRT наблюдается неправильный фолдинг белков и накопление неправильно свернутых белков [40]. Избыточная экспрессия CRT приводит к увеличению количества Ca^{2+} во внутриклеточных депо [41].

Предполагается, что поверхностный CRT играет роль в презентации антигенов, активации компонента [42], удалении апоптотических клеток [43], иммуногенности гибнущих раковых клеток [23], заживлении ран [44] и тромбоспондиновом сигналин-

ге [45]. CRT действует как второстепенный лиганд на поверхности клеток, необходимый для узнавания при фагоцитозе, стимулирующий LRP (белки, связанные с рецептором липопротеинов низкой плотности) на поверхности поглощающих клеток. Белок локализуется на внешней поверхности плазматической мембраны многих типов клеток, где он может играть определенную роль в обработке антигенов и служить посредником клеточной адгезии [40]. CRT, в норме расположенный в просвете эндоплазматического ретикулума, транслоцируется на внешнюю клеточную мембрану в комплексе с ERp57 в результате стресса ЭПР путем экзоцитоза (рис. 3). Транспорт CRT от ЭПР к мембране зависит от взаимодействия связанных с везикулами белков SNARE (рецепторов растворимого N-этилмалеимид-чувствительного белка прикрепления) с белками SNARE на мембране клетки [11, 21]. Кальретикулин на внешней плазматической мембране способен связываться с рецепторами CD91 дендритных клеток, что приводит к фагоцитозу погибающих клеток [46].

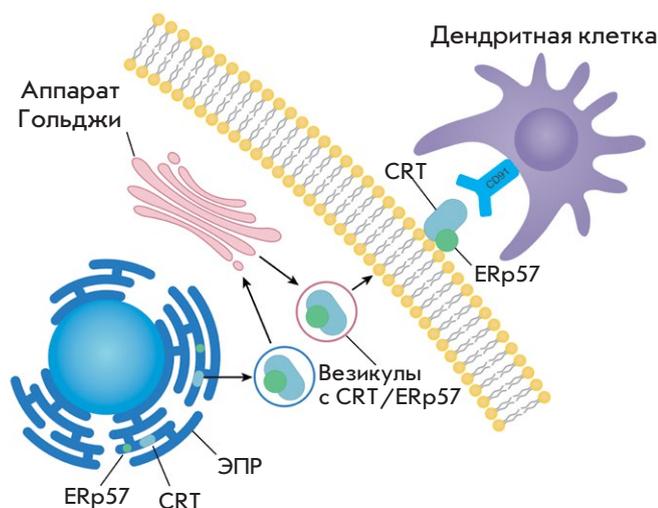


Рис. 3. Экспозиция кальретикулина (CRT) на внешнюю плазматическую мембрану и узнавание дендритными клетками

Сигнальная функция АТФ в активации иммунной системы

Погибающие клетки обозначают свое присутствие, выделяя хемотаксические факторы, известные как сигналы «найди меня», и через сигналы «съешь меня», служащие лигандами для поглощения. В настоящее время предложено несколько факторов, которые могут выступать в качестве сигналов «найди меня», в том числе: АТФ, УТФ, хемокин фракталкин (CX3CL1), лизофосфатидилхолин (LPC) и S1P [47]. При нарушении утилизации апоптотических клеток происходит их конверсия во вторично-некротические, что вызывает хроническое воспаление и ведет к развитию аутоиммунных заболеваний [35].

Выход АТФ во внеклеточное пространство характерен как для иммуногенного апоптоза, так и для некроза, сопровождающегося лизисом клетки. Однако между этими процессами существует несколько различий. В первую очередь, речь идет о количестве высвобождаемого АТФ. При апоптозе во внеклеточное пространство попадает менее 2% клеточного АТФ [48]. Характеризация АТФ как медиатора воспаления основана в значительной степени на способности активировать ионотропный нуклеотидный рецептор P2X7, который, в свою очередь, приводит к активации инфламмосомы и высвобождению провоспалительных цитокинов [49]. Во время некроза именно огромный выброс АТФ активирует инфламмосому и процесс воспаления. Тем не менее, концентрация АТФ, необходимая для активации пуринергических рецепторов P2X7, составляет не менее 100 мкМ, что значительно выше

концентрации, необходимой для активации хемотаксических рецепторов, таких, как P2Y2, и составляет менее 1 мкМ [50]. Интересно, что более низкие концентрации АТФ могут на самом деле оказывать противовоспалительное действие, подавляя секрецию воспалительных цитокинов, а также содействовать высвобождению цитокинов противовоспалительного характера [35]. Таким образом, АТФ нельзя рассматривать как универсальный сигнал развития воспаления.

Негистоновый хроматинсвязывающий ядерный белок HMGB1 и его функции в клетке

Белок HMGB1 принадлежит к семейству HMG (High mobility group) – ядерных негистоновых белков, необходимых для поддержания архитектуры хроматина. Внутри клетки HMGB1 взаимодействует с p53, TBR, Oct14, Нох, стероидными рецепторами и многими вирусными белками, эффективно регулируя экспрессию генов [51]. Показано, что HMGB1 может мигрировать между цитоплазмой и ядром клетки в зависимости от фазы клеточного цикла. Лимфоидные клетки содержат HMGB1 как в цитоплазме, так и в ядре [52].

Появление HMGB1 в межклеточном пространстве рассматривается как признак внезапного повреждения или некроза, потому что в этом случае хроматин повреждается необратимо. В очагах механического повреждения HMGB1 взаимодействует с рецептором конечных продуктов гликирования (RAGE), что усиливает продукцию TNF, IL-1, IL-8, MCP1, CDF1α и других факторов, привлекающих здоровые стволовые клетки в очаг повреждения [53]. HMGB1 может выделяться из клеток как активным, так и пассивным способом. Активная секреция HMGB1 связана с диссоциацией из комплекса с поврежденными хромосомами в результате ацетилирования гистонов, гиперацетилирования HMGB1 и монометилирования HMGB1. При некрозе наблюдается пассивная диффузия HMGB1. Однако при обычном, неиммуногенном, апоптозе HMGB1 не выделяется из плотно упакованных ядер апоптотических клеток [54]. Согласно [54], высвобождение HMGB1 из некротических опухолевых клеток, обработанных доксорубицином, в высоких концентрациях вызывающим некроз [55], способствует возобновлению роста опухоли и метастазированию по пути активации системы RAGE.

Белки теплового шока HSP70 и HSP90

Общим ответом на клеточный стресс, в том числе вызванный химиопрепаратами, является активация транскрипции ряда шаперонов, которые принадлежат к классу индуцибельных HSP-белков



Рис. 4. Классическая схема противоопухолевой вакцинации опухолевыми клетками, обработанными потенциальным индуктором ICD, с последующей ревакцинацией живыми опухолевыми клетками того же типа

или белков теплового шока. Белки теплового шока защищают клетку от гибели, проводя рефолдинг поврежденных белков или направляя испорченные белки в протеасомы для деградации [34].

У млекопитающих HSP70 участвует в процессах формирования, стабилизации и транспорта белков через мембраны митохондрий и ядра [56]. Шаперон HSP90 выполняет в клетке ряд функций, включая фолдинг, стабилизацию белков при тепловом шоке, способствует деградации белков [57]. Шаперон HSP90 стабилизирует многие белки, ответственные за рост опухоли, участвует в регуляции адгезии, инвазии, метастазирования, ангиогенеза и апоптоза, поэтому ингибиторы HSP90 рассматривают в качестве противоопухолевых агентов [58].

Кроме того, белки теплового шока HSP70 и HSP90 могут образовывать комплексы с пептидными антигенами, включая опухоль-специфические пептиды, что является необходимым и достаточным источником антигенов для презентации Т-клеткам. Свободные пептидные антигены не способны вызывать Т-клеточный ответ CD8⁺ лимфоцитов в отличие от антигенов, сопровождаемых белками теплового шока. В экспериментах на мышах *in vivo* показано, что комплексы антигенов с HSP70 и HSP90 могут служить источниками антигенов для эффективной кросс-презентации дендритными клетками [59].

ИНДУКЦИЯ ИММУНОГЕННОЙ КЛЕТочНОЙ ГИБЕЛИ *in vivo* ПРИ ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ ВАКЦИНАЦИИ

В настоящее время существует несколько моделей для исследования ICD *in vivo*. «Золотой стандарт» для оценки способности гибнущих клеток инициировать адаптивный иммунитет включает профилактическую вакцинацию иммунокомпетентных синген-

ных животных [5]. При таком подходе опухолевые клетки *in vitro* подвергают воздействию потенциального индуктора ICD, а затем трансплантируют подкожно в качестве вакцины без каких-либо иммунологических адъювантов. Через одну-две недели животным повторно трансплантируют живые опухолевые клетки того же типа в минимальной дозе, необходимой для образования опухолевых узлов, и наблюдают за ростом опухоли в течение 40–60 дней (рис. 4) [4, 35, 60]. Для оценки эффективности вакцинации учитывают не только долю мышей без опухоли, но обычно и скорость роста опухолей, если опухоли развиваются, несмотря на индуцированный вакциной адаптивный иммунный ответ. Специфичность развития противоопухолевого ответа подтверждается повторным заражением вакцинированных мышей без опухолей в конце эксперимента сингенными раковыми клетками другой линии, которые, как ожидается, вызовут прогрессирующие неопластические поражения у 100% мышей. Усиление эффективности терапии любым индуктором регулируемой гибели опухолей, растущих в иммунокомпетентных мышцах по сравнению с иммунодефицитными, указывает на потенциальную способность такого индуктора запускать ICD. Однако такая схема эксперимента не позволяет различить индукцию ICD и иммуностимуляцию, не связанную с ICD. Некоторые противоопухолевые препараты – доцетаксел, цисплатин, 5-фторурацил, гемцитабин и др. – не вызывают ICD, однако опосредуют иммуномодулирующие эффекты в микроокружении опухоли, напрямую воздействуя на популяции иммунных клеток. Хотя такие иммуномодулирующие эффекты важны для максимальной эффективности терапии в клинике, они не связаны с индукцией ICD [12, 61].

Таблица 2. Химиотерапевтические препараты, вызывающие иммуногенный апоптоз

Химиопрепараты	Типы опухолевых клеток	Признаки индукции ICD, DAMPs	Эффективность вакцинации, %
Антрациклины (доксорубин, даунорубин, идарубин), липосомы с доксорубином [4, 68]	Карцинома кишечника мышы СТ26	Экспозиция CRT, стресс ЭПР, фосфорилирование eIF2 α , высвобождение HMGB1, секреция ATP	Доксорубин, 80 Даунорубин, 35 Идарубин, 45
Оксалиплатин [9, 69–71]	Карцинома кишечника мышы СТ26, рак толстой кишки человека RKO и HCT116	Экспозиция CRT, высвобождение HMGB1	Оксалиплатин, 80
Ингибиторы микротрубочек (колхицин, SMQ, FMQ, нокодазол, эпотилон В, таксотер) [67, 72]	Карцинома кишечника мышы СТ26	Стресс ЭПР, экспозиция CRT, PERK-зависимое фосфорилирование eIF2 α	Нокодазол, 80
Сердечные гликозиды (дигоксин DIG, дигитоксин DIGT) [65, 73]	Фибросаркома мышы MCA205, меланома мышы B16	Экспозиция CRT, высвобождение HMGB1, секреция ATP	DIG/DIGT + цисплатин – 70–90 DIG/DIGT + митомидин – 60–90

Равноценным подходом к оценке ICD *in vivo* в иммунокомпетентных сингенных системах может быть измерение роста опухоли, локализованной дистантно от обрабатываемого опухолевого образования при использовании локально направленного ионизирующего излучения или внутриопухолевой доставки терапевтических агентов [62]. Такой подход также эффективен, если опухоль доступна только для цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ), например при метастазах в головном мозге у пациента, получающего химиопрепараты, которые не пересекают гематоэнцефалический барьер [63]. Модели так называемой «скрытой реакции», т.е. регрессии опухолевых поражений, находящихся далеко от места обработки ионизирующим излучением первичного опухолевого очага у пациентов, оказались очень полезными в этой ситуации [64]. Такое моделирование индукции ICD *ex vivo* позволяет характеризовать DAMPs, высвобождаемые опухолевыми клетками, реагирующими на стресс *in situ*; осуществлять иммунологическое профилирование АПК и ЦТЛ, лежащих в основе иницирования и реализации противоопухолевого иммунитета *in vivo*, а также идентифицировать последовательности запускаемых механизмов ICD и их соответствие с наблюдаемыми реакциями *in vitro*.

ПРЕПАРАТЫ, ВЫЗЫВАЮЩИЕ ИММУНОГЕННУЮ КЛЕТЧНУЮ ГИБЕЛЬ

Химиотерапевтические препараты

Впервые индукция иммуногенной клеточной гибели была показана для препарата антрациклинового ряда – доксорубин [4]. Некоторые химиотерапевтические препараты, часть из которых представле-

на в табл. 2, также обладают способностью индуцировать ICD [9, 65–67].

Пептиды с противоопухолевой активностью

Пептид LTX-315. Некоторые пептиды, обладающие противоопухолевой активностью, также способны индуцировать ICD. Например, такой катионный амфифильный синтетический пептид LTX-315 пермеабиллизует внутреннюю митохондриальную мембрану, вызывая некротическую гибель клеток [74]. Внутриопухолевые инъекции LTX-315 приводят к полному исчезновению меланомы мышы B16, причем такие мышы устойчивы к последующим инъекциям живых опухолевых клеток B16. Пептид LTX-315 вызывает активацию всех основных молекулярных маркеров ICD: экспозицию CRT, высвобождение HMGB1 и ATP, интерфероновый ответ без активации клеточных каспаз, что говорит о пути клеточной гибели, отличной от апоптоза [74, 75].

Противоопухолевый пептид RT53 класса CPP. Синтетический противоопухолевый пептид RT53, относящийся к классу CPP (белки с высокой проникающей способностью), вызывает гибель опухолевых клеток по пути нерегулируемого некроза с признаками ICD [76]. Показано, что после вакцинации RT53-обработанными клетками меланомы B16F10 только 25% мышы не имели опухолей в месте повторной трансплантации [77]. Формирование противоопухолевого иммунитета при действии пептида RT53 подтверждено также на мышах C57BL/6, которым провели профилактическую вакцинацию RT53-обработанными клетками фибросаркомы MCA205, что выражалось только в снижении темпа роста

опухолей, но не приводило к полному отсутствию опухоли в месте повторной трансплантации [76].

RIG-1-подобные геликазы. Среди пептидных индукторов ICD также можно отметить RIG-1-подобные геликазы. В отличие от LTX-315 и RT53, RIG-1-подобная геликаза RIG-1 вызывала гибель опухолевых клеток поджелудочной железы мыши Panc02 по пути апоптоза с признаками ICD. Помимо стандартного набора маркеров ICD было отмечено увеличение продукции интерферонов и некоторых провоспалительных цитокинов. Важно отметить, что дендритные клетки селезенки эффективно поглощают опухолевые клетки, обработанные RIG-1, и презентуют опухоль-ассоциированные антигены наивным CD8⁺ Т-клеткам [78].

Рекомбинантный аналог лактапина RL2. В недавних исследованиях было показано, что рекомбинантный аналог проапоптотического белка лактапина из молока человека (RL2) [79, 80] способен к индукции ICD *in vitro*, путем активации полного каскада маркеров иммуногенной клеточной гибели, а также к индукции противоопухолевой иммунной реакции в модели профилактической вакцинации [81]. Так, в экспериментах на иммунокомпетентных мышцах C3H/He показано, что вакцинация мышей RL2-обработанными клетками рабдомиосаркомы мыши MX-7 приводит к тому, что после повторной трансплантации опухолевый узел не развивался у 43% мышей. Также стоит отметить, что скорость роста опухолей, которые все же развились, была существенно ниже, чем в контрольной группе животных. Использование этилпирувата, ингибитора индоламин-2,3-диоксигеназы, в комбинации с клетками, инкубированными с RL2, усилило вакцинирующий эффект RL2-обработанных клеток до 60% [81].

Онколитические вирусы в индукции ICD

Показано, что гибель клеток, зараженных некоторыми немодифицированными онколитическими вирусами, такими, например, как вирусы болезни Ньюкасла, кори, осповакцины (ВОВ) и вирус коксаки В3, происходит с активацией типичных маркеров ICD [82–84]. Сравнение способности аденовируса человека, вируса леса Семлики и ВОВ дикого типа вызывать ICD показало, что все три вируса стимулируют высвобождение маркеров ICD, активацию и созревание дендритных клеток, однако только опухолевые клетки, инфицированные вирусом леса Семлики, стимулировали созревание Т-хелперов типа 1 (Th1) и индуцировали антиген-специфическую активацию Т-клеток [85].

Установлено, что дендритные клетки, фагоцитирующие опухолевые клетки, которые инфицированы ВОВ, не могут индуцировать Т-клеточные ответы. С другой стороны, аттенуированные ВОВ активировали пути STING и Batf3 в дендритных клетках и индуцировали мощный противоопухолевый иммунитет [86]. Таким образом, модификацию генома ВОВ можно, по-видимому, рассматривать в качестве стратегии преодоления иммуносупрессии, характерной для ВОВ дикого типа. Показано [84], что при инкубации с клетками меланомы человека вирус JX-594 (Pexa-Vec) вызывает экспозицию CRT, высвобождение HMGB1 и активацию/созревание дендритных клеток. Рекомбинантный вирус VV-GMCSF-Lact приводит к гибели опухолевых клеток различного гистологического происхождения с признаками ICD [87, 88]. Недавно обнаружили, что терапия глиомы вирусами болезни Ньюкасла индуцирует адаптивный иммунный ответ в отношении клеток глиомы, что является частью противоопухолевого ответа [89]. Рекомбинантный аденовирус, несущий трансген CD40, индуцирует Т-хелперный ответ типа 1, который ведет к активации цитотоксических Т-клеток и снижению иммуносупрессии [90].

Физико-химические подходы к противоопухолевой терапии с потенциалом индукторов ICD

В настоящее время показано, что вызывать гибель опухолевых клеток с признаками ICD способны различные подходы, в которых используются физические воздействия, такие, как ионизирующее излучение, фотохимиотерапия, фотодинамическая терапия, фотоиммунотерапия в ближнем инфракрасном диапазоне, высокое гидростатическое давление, тепловой шок, наноимпульсная стимуляция, гипертермия и облучение холодной плазмой [12].

Радиотерапия. Радиотерапия является одним из направлений местного лечения опухолей, однако известно, что ионизирующее излучение также приводит к элиминации опухолевых клеток в отдаленных метастазах, что говорит об активации иммунной системы при применении радиации [91]. В экспериментах *in vitro* показано, что радиотерапия вызывает дозозависимую гибель клеток трижды негативной опухоли молочной железы с экспозицией CRT и высвобождением АТР и HMGB1 [92]. Для усиления иммуногенной составляющей радиотерапии используют также комбинации с клинически эффективными химиопрепаратами, вызывающими иммуногенную клеточную гибель, например оксалиплатином или паклитакселом [92].

Гипертермия. В настоящее время было показано, что тепловой шок выше 42°C (гипертермия) способен запускать каскад ICD *in vitro* и вызывать иммуногенные эффекты на мышах. Так, профилактическая вакцинация опухолевыми клетками СТ26, подвергнутыми тепловому шоку (47°C), приводила к значительному торможению роста опухоли в месте инокуляции живых клеток и увеличению выживаемости вакцинированных животных [93].

Наноимпульсная стимуляция. Показано, что воздействие наноимпульсов приводит к полной регрессии слабоиммуногенной метастатической карциномы молочной железы мыши 4T1-Luc [94]. Интересно также наблюдение, согласно которому спонтанные метастазы в отдаленные органы реже детектировались даже у тех животных, у которых не произошла полная регрессия опухоли. После наноимпульсной стимуляции и регрессии опухоли все мыши были устойчивы к повторному заражению опухолевыми клетками, демонстрируя эффект, аналогичный вакцинации. Показано, что лечение наноимпульсами индуцировало противоопухолевый иммунитет, стимулировало созревание Т-клеток памяти, вело к разрушению микроокружения опухоли и снижало количество иммуносупрессорных клеток в микроокружении опухоли и крови.

Холодная плазменная струя (ХПС). Холодная плазменная струя (ХПС) – одно из новых перспективных направлений в лечении злокачественных образований. Обработка ХПС ведет к избирательной гибели клеток меланомы [95], опухолей кишечника [96], легкого [97, 98], поджелудочной железы [99], желудка [100], молочной железы [101], глиобластомы [102] *in vitro*.

Воздействие ХПС на опухолевые клетки также может запускать иммуногенную клеточную гибель. Показано, что гибель клеток меланомы Hmel1 MM и опухоли поджелудочной железы PANC-1 под воздействием культуральной среды, облученной ХПС, сопровождается экспозицией CRT и высвобождением АТР, что предполагает потенциальное использование активированных плазмой сред в качестве индуктора гибели клеток через активацию системы врожденного иммунитета [103]. Установлено, что даже фосфатный буфер, облученный ХПС, способен запускать каскад ICD *in vitro* [104]. Прямая обработка опухолевых клеток ХПС также может индуцировать ICD, вызывая экспозицию кальретикулина, HSP70 на внешнюю мембрану и секрецию АТР и HMGB1 [105]. Установлено также, что обработка опухолевых клеток ХПС *in vitro* вызывает высвобождение DAMPs, характерных для ICD,

и вакцинация мышей клетками СТ26, облученными ХПС, приводила к тому, что у 30% мышей не развивалась опухоль в месте повторного введения живых опухолевых клеток, а размер 90% опухолей, развившихся у вакцинированных мышей, был меньше среднего размера опухолей в контрольной группе [106]. Облучение опухолей рабдомиосаркомы MX-7 холодной плазмой *in vivo* вызывало временное увеличение уровня HMGB1 в сыворотке животных-опухоленосителей [105].

Таким образом, некоторые физические методы терапии опухолей можно рассматривать как индукторы ICD и оценивать вклад противоопухолевого иммунного ответа в эффективность терапии опухолей у пациентов.

ПОДАВЛЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ ИНДУКЦИИ ICD

Помимо эндогенных факторов, которые активируют иммунную систему, существует несколько механизмов супрессии иммунного ответа с помощью ингибирующих сигналов. В процессе прогрессии опухоль приобретает ряд свойств, которые позволяют ей ускользать от иммунной системы [107]. Микроокружение опухоли препятствует проникновению инфильтрирующих опухоль лимфоцитов, ограничивая поступление питательных ресурсов и выделяя ингибиторные сигналы. В развитии иммуносупрессивного микроокружения опухоли важное место занимают плазмацитоидные дендритные клетки, опухоль-ассоциированные макрофаги и миелоидные супрессорные клетки, секретирующие противовоспалительные цитокины и экспрессирующие иммуносупрессорные метаболические ферменты, такие, как индуцибельная синтаза оксида азота (iNOS), индоламин-2,3-диоксигеназа (IDO), триптофан-2,3-диоксигеназа (TDO) и аргиназа [108, 109]. Уменьшение количества триптофана под действием IDO1 и одновременное увеличение уровня его метаболитов стимулирует иммуносупрессивные свойства опухоли и ее микроокружения преимущественно за счет развития толерантности АПК, иммунотолерантности Т-клеток и гибели иммунных клеток [110]. Такое подавление Т-клеточного метаболизма может ингибировать эффекторную активность Т-клеток, одновременно стимулируя регуляторные Т-клетки и выступая в качестве барьера для эффективной иммунотерапии. Для опухолей характерно быстрое истощение питательных веществ, например глюкозы, и накопление продуктов метаболизма, таких, как лактат или кинуренин, которые непосредственно ингибируют Т-клетки [111]. Наряду с такими сигналами, как CRT, которые привлекают клетки с фагоцитарной активностью, опу-

холевые клетки способны экспонировать на своей поверхности молекулы, являющиеся антагонистами сигналов «съешь меня» (молекулы CD47), что подавляет кальретикулин-опосредованный фагоцитоз. Взаимодействие CD47 с рецептором SIRP α на дендритных клетках служит сигналом, ингибирующим фагоцитоз [112]. Активация перечисленных механизмов, вероятно, может мешать реализации каскада ICD и защищать опухолевые клетки от атаки иммунной системы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Иммуногенная гибель клеток представляет собой уникальную реакцию, которая инициируется клеточным стрессом и завершается гибелью клеток с активной секрецией или пассивным высвобождением

многочисленных аларминов. Важное значение ICD в борьбе с онкологическими заболеваниями обусловлено ее способностью вызывать противоопухолевые иммунные реакции, которые усиливают терапевтический эффект препаратов химиотерапии и радиотерапии. Подробное исследование молекулярных маркеров ICD позволит прогнозировать активацию противоопухолевого иммунного ответа *in vivo* при использовании определенных противоопухолевых препаратов и подходов. ●

*Обзор подготовлен при поддержке
РФФИ № 19-34-90134 (Аспиранты), РНФ
№ 19-19-00255 и проекта базового бюджетного
финансирования Минобрнауки РФ
№ 0245-2019-0001.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Vacchelli E., Aranda F., Eggermont A., Galon J., Sautès-Fridman C., Cremer I., Zitvogel L., Kroemer G., Galluzzi L. // *Oncoimmunology*. 2014. V. 3. № 1. P. e27878.
- Богданова И.М., Пономаренко Е.А. // *Иммунология*. 2015. Т. 36. № 3. С. 158–161.
- Vacchelli E., Senovilla L., Eggermont A., Fridman W.H., Galon J., Zitvogel L., Kroemer G., Galluzzi L. // *Oncoimmunology*. 2013. V. 2. № 3. P. e23510.
- Casares N., Pequignot M.O., Tesniere A., Ghiringhelli F., Roux S., Chaput N., Schmitt E., Hamai A., Hervas-Stubbs S., Obeid M., et al. // *J. Exp. Med.* 2005. V. 202. № 12. P. 1691–1701.
- Kepp O., Senovilla L., Vitale I., Vacchelli E., Adjemian S., Agostinis P., Apetoh L., Aranda F., Barnaba V., Bloy N., et al. // *Oncoimmunology*. 2014. V. 3. № 9. P. e955691.
- Galluzzi L., Bravo-San Pedro J.M., Vitale I., Aaronson S.A., Abrams J.M., Adam D., Alnemri E.S., Altucci L., Andrews D., Annicchiarico-Petruzzelli M., et al. // *Cell Death Differ.* 2015. V. 22. № 1. P. 58–73.
- Davidovich P., Kearney C.J., Martin S.J. // *Biol. Chem.* 2014. V. 395. № 10. P. 1163–1171.
- Scheffer S.R., Nave H., Korangy F., Schlote K., Pabst R., Jaffee E.M., Manns M.P., Greten T.F. // *Int. J. Cancer*. 2003. V. 103. № 2. P. 205–211.
- Tesniere A., Schlemmer F., Boige V., Kepp O., Martins I., Ghiringhelli F., Aymeric L., Michaud M., Apetoh L., Barault L., et al. // *Oncogene*. 2010. V. 29. № 4. P. 482–491.
- Menger L., Vacchelli E., Adjemian S., Martins I., Ma Y., Shen S., Yamazaki T., Sukkurwala A.Q., Michaud M., Mignot G., et al. // *Sci. Transl. Med.* 2012. V. 4. № 143. P. 143ra99.
- Panaretakis T., Kepp O., Brockmeier U., Tesniere A., Bjorklund A.-C., Chapman D.C., Durchschlag M., Joza N., Pierron G., van Endert P., et al. // *EMBO J.* 2009. V. 28. № 5. P. 578–590.
- Galluzzi L., Vitale I., Warren S., Adjemian S., Agostinis P., Martinez A.B., Chan T.A., Coukos G., Demaria S., Deutsch E., et al. // *J. Immunother. Cancer*. 2020. V. 8. № 1. P. e000337.
- Bezu L., Sauvat A., Humeau J., Gomes-da-Silva L.C., Iribarren K., Forveille S., Garcia P., Zhao L., Liu P., Zitvogel L., et al. // *Cell Death Differ.* 2018. V. 25. № 8. P. 1375–1393.
- Garg A.D., Agostinis P. // *Immunol. Rev.* 2017. V. 280. № 1. P. 126–148.
- Rufo N., Garg A.D., Agostinis P. // *Trends in Cancer*. 2017. V. 3. № 9. P. 643–658.
- Garg A.D., Krysko D.V., Verfaillie T., Kaczmarek A., Ferreira G.B., Marysael T., Rubio N., Firczuk M., Mathieu C., Roebroek A.J.M., et al. // *EMBO J.* 2012. V. 31. № 5. P. 1062–1079.
- Sukkurwala A.Q., Martins I., Wang Y., Schlemmer F., Ruckstuhl C., Durchschlag M., Michaud M., Senovilla L., Sistigu A., Ma Y., et al. // *Cell Death Differ.* 2014. V. 21. № 1. P. 59–68.
- Tufi R., Panaretakis T., Bianchi K., Criollo A., Fazi B., Di Sano F., Tesniere A., Kepp O., Paterlini-Brechot P., Zitvogel L., et al. // *Cell Death Differ.* 2008. V. 15. № 2. P. 274–282.
- Moserova I., Truxova I., Garg A.D., Tomala J., Agostinis P., Cartron P.F., Vosahlikova S., Kovar M., Spisek R., Fucikova J. // *Oncoimmunology*. 2017. V. 6. № 1. P. e1258505.
- Colangelo T., Polcaro G., Ziccardi P., Muccillo L., Galgani M., Pucci B., Rita Milone M., Budillon A., Santopaolo M., Mazzoccoli G., et al. // *Cell Death Dis.* 2016. V. 7. № 2. P. e2108–e2108.
- Liu C.-C., Leclair P., Pedari F., Vieira H., Monajemi M., Sly L.M., Reid G.S., Lim C.J. // *Front. Oncol.* 2019. V. 9. P. 411.
- Chen X., Fosco D., Kline D.E., Kline J. // *Oncoimmunology*. 2017. V. 6. № 4. P. e1278332.
- Obeid M., Tesniere A., Ghiringhelli F., Fimia G.M., Apetoh L., Perfettini J.-L., Castedo M., Mignot G., Panaretakis T., Casares N., et al. // *Nature Medicine*. 2007. V. 13. № 1. P. 54–61.
- De Boo S., Kopecka J., Brusa D., Gazzano E., Matera L., Ghigo D., Bosia A., Riganti C. // *Mol. Cancer*. 2009. V. 8. P. 108.
- Martins I., Kepp O., Schlemmer F., Adjemian S., Tailler M., Shen S., Michaud M., Menger L., Gdoura A., Tajeddine N., et al. // *Oncogene*. 2011. V. 30. № 10. P. 1147–1158.
- Garg A.D., Krysko D.V., Vandenabeele P., Agostinis P. // *Oncoimmunology*. 2012. V. 1. № 5. P. 786–788.
- Fucikova J., Kralikova P., Fialova A., Brtnicky T., Rob L., Bartunkova J., Spisek R. // *Cancer Research*. 2011. V. 71. № 14. P. 4821–4833.
- Martins I., Tesniere A., Kepp O., Michaud M., Schlemmer F., Senovilla L., Séror C., Métivier D., Perfettini J.-L., Zitvogel L., et al. // *Cell Cycle*. 2009. V. 8. № 22. P. 3723–3728.

29. Krysko D.V., Garg A.D., Kaczmarek A., Krysko O., Agostinis P., Vandenabeele P. // *Nat. Rev. Cancer*. 2012. V. 12. № 12. P. 860–875.
30. Inoue H., Tani K. // *Cell Death Differ*. 2014. V. 21. № 1. P. 39–49.
31. Yatim N., Jusforgues-Saklani H., Orozco S., Schulz O., Barreira da Silva R., Reis e Sousa C., Green D.R., Oberst A., Albert M.L. // *Science*. 2015. V. 350. № 6258. P. 328–334.
32. Bedard K., Szabo E., Michalak M., Opas M. // *Int. Rev. Cytol*. 2005. V. 245. P. 91–121.
33. Pawaria S., Binder R.J. // *Nat. Commun*. 2011. V. 2. № 1. P. 521.
34. Zitvogel L., Apetoh L., Ghiringhelli F., Kroemer G. // *Nat. Rev. Immunol*. 2008. V. 8. № 1. P. 59–73.
35. Apetoh L., Ghiringhelli F., Tesniere A., Obeid M., Ortiz C., Criollo A., Mignot G., Maiuri M.C., Ullrich E., Saulnier P., et al. // *Nat. Med*. 2007. V. 13. № 9. P. 1050–1059.
36. Chekeni F.B., Ravichandran K.S. // *J. Mol. Med. (Berlin)*. 2011. V. 89. № 1. P. 13–22.
37. Vacchelli E., Galluzzi L., Eggermont A., Galon J., Tartour E., Zitvogel L., Kroemer G. // *Oncoimmunology*. 2012. V. 1. № 4. P. 493–506.
38. Льюин Б., Кассимерис В., Лингаппа П., Плоппер Д. Клетки. // Пер. с англ. М.: Бином, 2011. 952 с.
39. Corbett E.F., Michalak M. // *Trends Biochem. Sci*. 2000. V. 25. № 7. P. 307–311.
40. Michalak M., Groenendyk J., Szabo E., Gold L.I., Opas M. // *Biochem. J*. 2009. V. 417. № 3. P. 651–666.
41. Mery L., Mesaeli N., Michalak M., Opas M., Lew D.P., Krause K.H. // *J. Biol. Chem*. 1996. V. 271. № 16. P. 9332–9339.
42. Gao B., Adhikari R., Howarth M., Nakamura K., Gold M.C., Hill A.B., Knee R., Michalak M., Elliott T. // *Immunity*. 2002. V. 16. № 1. P. 99–109.
43. Gardai S.J., McPhillips K.A., Frasca S.C., Janssen W.J., Starefeldt A., Murphy-Ullrich J.E., Bratton D.L., Oldenborg P.-A., Michalak M., Henson P.M. // *Cell*. 2005. V. 123. № 2. P. 321–334.
44. Gold L.I., Rahman M., Blechman K.M., Greives M.R., Churgin S., Michaels J., Callaghan M.J., Cardwell N.L., Polins A.C., Michalak M., et al. // *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc*. 2006. V. 11. № 1. P. 57–65.
45. Goicoechea S., Pallero M.A., Eggleton P., Michalak M., Murphy-Ullrich J.E. // *J. Biol. Chem*. 2002. V. 277. № 40. P. 37219–37228.
46. Asadzadeh Z., Safarzadeh E., Safaei S., Baradaran A., Mohammadi A., Hajasgharzadeh K., Derakhshani A., Argentiario A., Silvestris N., Baradaran B. // *Cancers (Basel)*. 2020. V. 12. № 4. P. 1047.
47. Medina C.B., Ravichandran K.S. // *Cell Death Differ*. 2016. V. 23. № 6. P. 979–989.
48. Elliott M.R., Chekeni F.B., Trampont P.C., Lazarowski E.R., Kadl A., Walk S.F., Park D., Woodson R.L., Ostankovich M., Sharma P., et al. // *Nature*. 2009. V. 461. № 7261. P. 282–286.
49. Bours M.J.L., Swennen E.L.R., Di Virgilio F., Cronstein B.N., Dagnelie P.C. // *Pharmacol. Ther*. 2006. V. 112. № 2. P. 358–404.
50. Trautmann A. // *Sci. Signal*. 2009. V. 2. № 56. P. e6.
51. Agresti A., Bianchi M.E. // *Curr Opin Genet. Dev*. 2003. V. 13. № 2. P. 170–178.
52. Landsman D., Bustin M. // *Bioessays*. 1993. V. 15. № 8. P. 539–546.
53. Scaffidi P., Misteli T., Bianchi M.E. // *Nature*. 2002. V. 418. № 6894. P. 191–195.
54. Luo Y., Chihara Y., Fujimoto K., Sasahira T., Kuwada M., Fujiwara R., Fujii K., Ohmori H., Kuniyasu H. // *Eur. J. Cancer*. 2013. V. 49. № 3. P. 741–751.
55. Vu M., Kassouf N., Ofili R., Lund T., Bell C., Appiah S. // *International Journal of Oncology*. 2020. V. 57. № 1. P. 113–121.
56. Hartl F.U. // *Nature*. 1996. V. 381. № 6583. P. 571–579.
57. Buchner J. // *Trends in Biochemical Sciences*. 1999. V. 24. № 4. P. 136–141.
58. Wu J., Liu T., Rios Z., Mei Q., Lin X., Cao S. // *Trends Pharmacol Sci*. 2017. V. 38. № 3. P. 226–256.
59. Binder R.J., Srivastava P.K. // *Nat. Immunol*. 2005. V. 6. № 6. P. 593–599.
60. Dudek-Perić A.M., Ferreira G.B., Muchowicz A., Wouters J., Prada N., Martin S., Kiviluoto S., Winiarska M., Boon L., Mathieu C., et al. // *Cancer Res*. 2015. V. 75. № 8. P. 1603–1614.
61. Galluzzi L., Buqué A., Kepp O., Zitvogel L., Kroemer G. // *Cancer Cell*. 2015. V. 28. № 6. P. 690–714.
62. Twyman-Saint Victor C., Rech A.J., Maity A., Rengan R., Pauken K.E., Stelekati E., Benci J.L., Xu B., Dada H., Odorizzi P.M., et al. // *Nature*. 2015. V. 520. № 7547. P. 373–377.
63. Quail D.F., Joyce J.A. // *Cancer Cell*. 2017. V. 31. № 3. P. 326–341.
64. Ngwa W., Irabor O.C., Schoenfeld J.D., Hesser J., Demaria S., Formenti S.C. // *Nat. Rev. Cancer*. 2018. V. 18. № 5. P. 313–322.
65. Menger L., Vacchelli E., Adjemian S., Martins I., Ma Y., Shen S., Yamazaki T., Sukkurwala A.Q., Michaud M., Mignot G., et al. // *Science Translational Medicine*. 2012. V. 4. № 143. P. 143ra99–143ra99.
66. Spisek R., Charalambous A., Mazumder A., Vesole D.H., Jagannath S., Dhodapkar M.V. // *Blood*. 2007. V. 109. № 11. P. 4839–4845.
67. Senovilla L., Vitale I., Martins I., Tailler M., Pailleret C., Michaud M., Galluzzi L., Adjemian S., Kepp O., Niso-Santano M., et al. // *Science*. 2012. V. 337. № 6102. P. 1678–1684.
68. Huang F.-Y., Lei J., Sun Y., Yan F., Chen B., Zhang L., Lu Z., Cao R., Lin Y.-Y., Wang C.-C., et al. // *Oncoimmunology*. 2018. V. 7. № 7. P. e1446720.
69. Zhu H., Shan Y., Ge K., Lu J., Kong W., Jia C. // *Cell Oncol. (Dordr)*. 2020. V. 43. № 6. P. 1203–1214.
70. Sun L., Shen F., Tian L., Tao H., Xiong Z., Xu J., Liu Z. // *Adv. Mater*. 2021. V. 33. № 18. P. e2007910.
71. Liu X., Jiang J., Chang C.H., Liao Y.-P., Lodico J.J., Tang I., Zheng E., Qiu W., Lin M., Wang X., et al. // *Small*. 2021. V. 17. № 14. P. e2005993.
72. Wen C.-C., Chen H.-M., Chen S.-S., Huang L.-T., Chang W.-T., Wei W.-C., Chou L.-C., Arulselvan P., Wu J.-B., Kuo S.-C., et al. // *Journal of Biomedical Science*. 2011. V. 18. № 1. P. 44.
73. Xiang Y., Chen L., Li L., Huang Y. // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2020. V. 12. № 1. P. 1606–1616.
74. Forveille S., Zhou H., Sauvat A., Bezu L., Müller K., Liu P., Zitvogel L., Pierron G., Rekdal O., Kepp O., et al. // *Cell Cycle*. 2015. V. 14. № 21. P. 3506–3512.
75. Eike L.-M., Yang N., Rekdal O., Sveinbjørnsson B. // *Oncotarget*. 2015. V. 6. № 33. P. 34910–34923.
76. Pasquereau-Kotula E., Habault J., Kroemer G., Poyet J.-L. // *PLoS One*. 2018. V. 13. № 8. P. e0201220.
77. Jagot-Lacoussiere L., Kotula E., Villoutreix B.O., Bruzzoni-Giovanelli H., Poyet J.-L. // *Cancer Res*. 2016. V. 76. № 18. P. 5479–5490.
78. DUEWELL P., STEGER A., LOHR H., BOURHIS H., HOELZ H., KIRCHLEITNER S.V., STIEG M.R., GRASSMANN S., KOBOLD S., SIVEKE J.T., et al. // *Cell Death Differ*. 2014. V. 21. № 12. P. 1825–1837.

79. Koval O.A., Tkachenko A.V., Fomin A.S., Semenov D.V., Nushtaeva A.A., Kuligina E.V., Zavjalov E.L., Richter V.A. // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 4. P. e93921.
80. Semenov D.V., Fomin A.S., Kuligina E.V., Koval O.A., Matveeva V.A., Babkina I.N., Tikunova N.V., Richter V.A. // *Protein J*. 2010. V. 29. № 3. P. 174–180.
81. Troitskaya O., Varlamov M., Nushtaeva A., Richter V., Koval O. // *Molecules*. 2020. V. 25. № 12. P. 2804.
82. Donnelly O.G., Errington-Mais F., Steele L., Hadac E., Jennings V., Scott K., Peach H., Phillips R.M., Bond J., Pandha H., et al. // *Gene Ther*. 2013. V. 20. № 1. P. 7–15.
83. Miyamoto S., Inoue H., Nakamura T., Yamada M., Sakamoto C., Urata Y., Okazaki T., Marumoto T., Takahashi A., Takayama K., et al. // *Cancer Res*. 2012. V. 72. № 10. P. 2609–2621.
84. Heinrich B., Klein J., Delic M., Goepfert K., Engel V., Geberzahn L., Lusky M., Erbs P., Preville X., Moehler M. // *OTT*. 2017. V. 10. P. 2389–2401.
85. Ma J., Ramachandran M., Jin C., Quijano-Rubio C., Martikainen M., Yu D., Essand M. // *Cell Death Dis*. 2020. V. 11. № 1. P. 48.
86. Dai P., Wang W., Yang N., Serna-Tamayo C., Ricca J.M., Zamarin D., Shuman S., Merghoub T., Wolchok J.D., Deng L. // *Sci. Immunol*. 2017. V. 2. № 11. P. eaal1713.
87. Koval O., Kochneva G., Tkachenko A., Troitskaya O., Sivolobova G., Grazhdantseva A., Nushtaeva A., Kuligina E., Richter V. // *BioMed Research International*. 2017. V. 2017. P. 1–14.
88. Kochneva G., Sivolobova G., Tkacheva A., Grazhdantseva A., Troitskaya O., Nushtaeva A., Tkachenko A., Kuligina E., Richter V., Koval O. // *Oncotarget*. 2016. V. 7. № 45. P. 74171–74188.
89. Koks C.A., Garg A.D., Ehrhardt M., Riva M., Vandenberk L., Boon L., De Vleeschouwer S., Agostinis P., Graf N., van Gool S.W. // *Int. J. Cancer*. 2015. V. 136. № 5. P. E313–325.
90. Diaconu I., Cerullo V., Hirvonen M.L.M., Escutenaire S., Ugolini M., Pesonen S.K., Bramante S., Parviainen S., Kanerva A., Loskog A.S.I., et al. // *Cancer Res*. 2012. V. 72. № 9. P. 2327–2338.
91. Golden E.B., Demaria S., Schiff P.B., Chachoua A., Formenti S.C. // *Cancer Immunol. Res*. 2013. V. 1. № 6. P. 365–372.
92. Golden E.B., Frances D., Pellicciotta I., Demaria S., Helen Barcellos-Hoff M., Formenti S.C. // *Oncoimmunology*. 2014. V. 3. P. e28518.
93. Adkins I., Sadilkova L., Hradilova N., Tomala J., Kovar M., Spisek R. // *Oncoimmunology*. 2017. V. 6. № 5. P. e1311433.
94. Guo S., Jing Y., Burcus N.I., Lassiter B.P., Tanaz R., Heller R., Beebe S.J. // *Int. J. Cancer*. 2018. V. 142. № 3. P. 629–640.
95. Zirnheld J.L., Zucker S.N., DiSanto T.M., Berezney R., Etemadi K. // *IEEE Trans. Plasma Sci*. 2010. V. 38. № 4. P. 948–952.
96. Georgescu N., Lupu A.R. // *IEEE Trans. Plasma Sci*. 2010. V. 38. № 8. P. 1949–1955.
97. Schweigert I., Zakrevsky D., Gugin P., Yelak E., Golubitskaya E., Troitskaya O., Koval O. // *Applied Sciences*. 2019. V. 9. № 21. P. 4528.
98. Golubitskaya E.A., Troitskaya O.S., Yelak E.V., Gugin P.P., Richter V.A., Schweigert I.V., Zakrevsky D.E., Koval O.A. // *Acta Naturae*. 2019. V. 11. № 3. P. 16–19.
99. Liedtke K.R., Bekeschus S., Kaeding A., Hackbarth C., Kuehn J.-P., Heidecke C.-D., von Bernstorff W., von Woedtke T., Partecke L.I. // *Scientific Reports*. 2017. V. 7. № 1. P. 8319.
100. Chen Z., Lin L., Cheng X., Gjika E., Keidar M. // *Biointerphases*. 2016. V. 11. № 3. P. 031010.
101. Kumar N., Attri P., Choi E.H., Uhm H.S. // *RSC Adv*. 2015. V. 5. № 19. P. 14670–14677.
102. Conway G.E., Casey A., Milosavljevic V., Liu Y., Howe O., Cullen P.J., Curtin J.F. // *British Journal of Cancer*. 2016. V. 114. № 4. P. 435–443.
103. Azzariti A., Iacobazzi R.M., Di Fonte R., Porcelli L., Gristina R., Favia P., Fracassi F., Trizio I., Silvestris N., Guida G., et al. // *Sci. Rep*. 2019. V. 9. № 1. P. 4099.
104. Van Loenhout J., Flieswasser T., Freire Boulosa L., De Waele J., Van Audenaerde J., Marcq E., Jacobs J., Lin A., Lion E., Dewitte H., et al. // *Cancers*. 2019. V. 11. № 10. P. 1597.
105. Troitskaya O., Golubitskaya E., Biryukov M., Varlamov M., Gugin P., Milakhina E., Richter V., Schweigert I., Zakrevsky D., Koval O. // *IJMS*. 2020. V. 21. № 14. P. 5128.
106. Lin A.G., Xiang B., Merlino D.J., Baybutt T.R., Sahu J., Fridman A., Snook A.E., Miller V. // *Oncoimmunology*. 2018. V. 7. № 9. P. e1484978.
107. Барышников А.Ю. // *Практическая онкология*. 2003. T. 4. № 3. С. 127–130.
108. Gabrilovich D.I., Ostrand-Rosenberg S., Bronte V. // *Nat. Rev. Immunol*. 2012. V. 12. № 4. P. 253–268.
109. Munn D.H. // *Science*. 1998. V. 281. № 5380. P. 1191–1193.
110. Soliman H., Mediavilla-Varela M., Antonia S. // *The Cancer Journal*. 2010. V. 16. № 4. P. 354–359.
111. Beckermann K.E., Dudzinski S.O., Rathmell J.C. // *Cytokine Growth Factor Rev*. 2017. V. 35. P. 7–14.
112. Chao M.P., Jaiswal S., Weissman-Tsukamoto R., Alizadeh A.A., Gentles A.J., Volkmer J., Weiskopf K., Willingham S.B., Raveh T., Park C.Y., et al. // *Sci. Transl. Med*. 2010. V. 2. № 63. P. 63ra94.

УДК 620.3

Распознающие скаффолдовые полипептиды как инструмент для адресной доставки наноструктур *in vitro* и *in vivo*

В. О. Шипунова*, С. М. Деев

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

*E-mail: viktoriya.shipunova@phystech.edu

Поступила в редакцию 04.08.2021

Принята к печати 20.12.2021

DOI: 10.32607/actanaturae.11545

РЕФЕРАТ Традиционные средства адресной доставки наноструктур, такие, как антитела, трансферрин, лектины или аптамеры, зачастую могут вызывать целый спектр нежелательных эффектов. При этом большой размер антител часто не позволяет разместить необходимое количество молекул на поверхности наноструктур, а константные домены тяжелых цепей, благодаря их эффекторным функциям, могут вызывать фагоцитоз. В последние два десятилетия гораздо более эффективными инструментами для направленной доставки считаются миметики антител – адресные полипептидные скаффолдовые (каркасные) молекулы неиммуноглобулиновой природы. Они обладают малым размером (3–20 кДа), высокой аффинностью (от субнано- до фемтомолярных значений констант связывания), низкой иммуногенностью, исключительной термодинамической стабильностью. Эти молекулы эффективно нарабатывают в бактериальных продуцентах и с помощью генно-инженерных манипуляций создают мультиспецифичные белки слияния для нацеливания наночастиц на клетки с заданным молекулярным профилем, что делает скаффолдовые полипептиды оптимальным средством для тераностики.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА наночастицы, дарпины, аффибоди, антикарины, каркасные белки, ADAPT, HER2, HER1, EGFR, EpCAM, конъюгация, адресная доставка.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ЛППР – локализованный поверхностный плазмонный резонанс; МРТ – магнитно-резонансная томография; МЧ – магнитные наночастицы; ПМАО – чередующийся сополимер малеинового ангидрида с 1-октадеценом; ПЭГ – полиэтиленгликоль; ПЭТ – позитронно-эмиссионная томография; ADAPT – каркасный белок на основе домена, связывающего альбумин; Bs-C-Mms6 – барстар, слитый с C-Mms6; DARP – дарпин (designed ankyrin repeat protein); DARP 9_29-Bn – дарпин 9_29, слитый с барназой; DARP-LoPE – дарпин 9_29, слитый с LoPE; DOTA – додекантетрауксусная кислота; EDC – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид; eEF2 – эукариотический фактор элонгации 2; IGF-1R – рецептор инсулиноподобного фактора роста 1; EpCAM – рецептор, молекула клеточной адгезии эпителия; EPR – эффект повышенной проницаемости и удержания; HER2 – рецептор эпидермального фактора роста 2 человека; IgE – иммуноглобулин E; IgG – иммуноглобулин G; NHS – гидроксисукцинимид; PE, ETA – экзотоксин A синегнойной палочки *Pseudomonas aeruginosa*; PRINT – технология репликации в несмачиваемых молдах (particle replication in nonwetting templates); ScFv – одноцепочечный фрагмент легкой и тяжелой цепи иммуноглобулина; SBP – пептид, связывающий SiO₂-поверхность; SPIO – суперпарамагнитные наночастицы; TNF-α – фактор некроза опухоли; VEGF-A – фактор роста сосудистого эндотелия.

1. ВВЕДЕНИЕ

Разработка новых и совершенствование уже существующих методов высокочувствительной диагностики и адресной терапии онкологических заболеваний – одно из основных направлений современной нанобиомедицины. При этом ключевую проблему

тераностики относительно нового подхода к созданию препаратов, которые одновременно являются средствами ранней диагностики, терапевтическими агентами и инструментами мониторинга эффективности проводимой терапии, представляет адресная доставка препаратов [1, 2].

Перспективными объектами для создания агентов для тераностики являются наночастицы различной природы (рис. 1). Наночастицы обладают самым широким спектром уникальных характеристик: имеют малый размер, высокое соотношение площади поверхности к количеству объемных атомов, способность образовывать комплексы «наночастица–лиганд», в том числе с большими (относительно собственного размера) соединениями (такими, как белки, различные лекарственные препараты и др.), и селективно доставлять их к заданной цели, реализуя тем самым стратегию адресной доставки. Эти и многие другие преимущества позволяют использовать наночастицы в качестве диагностических и терапевтических агентов в различных областях медицины, в частности, для обнаружения и оптической визуализации злокачественных новообразований и адресной доставки лекарственных препаратов. Однако успешное внедрение нанобиокомплексов в клиническую практику ограничено рядом причин. Так, в частности, необходимо иметь конструкции, обладающие минимальной токсичностью, высокой специфичностью распознавания мишени, максимальной терапевтической и нацеливающей эффективностью. При этом такие комплексы должны обладать низкой иммуногенностью, чтобы обеспечить возможность проведения нескольких курсов терапии.

В терапии опухолей уже применяется более 20 препаратов на основе наночастиц, а ряд соединений проходит завершающие фазы клинических испытаний. Эффективность этих препаратов, например, липосомной формы доксорубина (липосомы – Миоцет или липосомы, покрытые ПЭГ – Келикс) или мицеллярной формы паклитаксела (Генексол-PM), основана на эффекте повышенной проницаемости и удержания сосудов опухоли (EPR-эффект, enhanced permeability and retention effect). В связи с высокой потребностью в кислороде и питании в опухоли возникает новая сосудистая сеть, сформированная дефектными эндотелиальными клетками с широкими фенестрациями (до 4 мкм), при этом сосуды не имеют гладкомышечного слоя и эндотелиальные клетки обладают недостатком рецепторов ангиотензина II. Нарушение лимфооттока, наблюдаемое в агрегатах опухолевых клеток размером 150–200 мкм, окруженных такой сосудистой сетью, позволяет молекулам и наноструктурам размером до 150 нм задерживаться в области опухоли и оказывать терапевтическое воздействие.

Однако EPR-эффект характеризуется значительной гетерогенностью (как между разными опухолевыми моделями, так и в пределах даже одной опухоли) и гораздо более выражен у грызунов с ксенографтными опухолями по сравнению с опу-

холями у людей. Это связано с более низкой скоростью роста опухоли у человека и формированием нормальной сосудистой сети с развитым лимфооттоком по сравнению с быстропролиферирующими опухолями у грызунов [3, 4]. При этом, даже в случае действительно сильного EPR-эффекта (например, при быстро развивающейся саркоме Капоши), в опухоль попадает лишь незначительное число введенных наночастиц (менее 0.7%) [5]. На сегодняшний день нерешенными остаются следующие проблемы нанобиомедицины: терапия агрессивных метастазирующих опухолей [6], интеграция методов персонализированной неинвазивной диагностики и терапии [7], создание физиологически релевантных животных моделей с ксенотрансплантатами [4].

Существуют различные подходы к направленной доставке соединений в область опухоли, в основном, предполагающие повышение эффективности связывания с раковыми клетками, клетками эндотелия или клетками иммунной системы [8], интернализацию соединений в клетку и их контролируемое высвобождение (в том числе под воздействием внешних факторов – света, pH, температур, электромагнитных полей и др.) [9–13]. Поверхность наноструктур модифицируют направляющими агентами различной природы, например, антителами и их производными [14, 15], трансферрином, эпидермальным фактором роста, лектинами [16], молекулами на основе ДНК/РНК (аптамеры, белково-нуклеиновые кислоты), низкомолекулярными веществами (фолиевая кислота, сахара – например, галактозамин) и другими соединениями.

Использование этих молекул приводит к целому спектру нежелательных эффектов. Так, большой размер антител IgG часто не позволяет эффективно использовать поверхность наноструктур при их модификации; константные домены тяжелых цепей обладают эффекторными функциями, которые могут вызывать фагоцитоз, приводя к воспалительным процессам, не участвуя при этом в селективном распознавании мишени, или к нежелательной иммуномодуляции *in vivo*. Размер антител ограничивает диффузию молекул в глубину опухоли.

Более эффективными инструментами нацеливания наноструктур на клетки-мишени представляются адресные полипептидные каркасные молекулы неиммуноглобулиновой природы, которые получают технологиями фагового, клеточного или рибосомного дисплея. Данные полипептиды получают путем мутагенеза белковых мотивов, участвующих в белок-белковых взаимодействиях в живых системах. К наиболее ярким представителям данной группы нацеливающих соединений относятся аффибоды и дарпины (рис. 1).

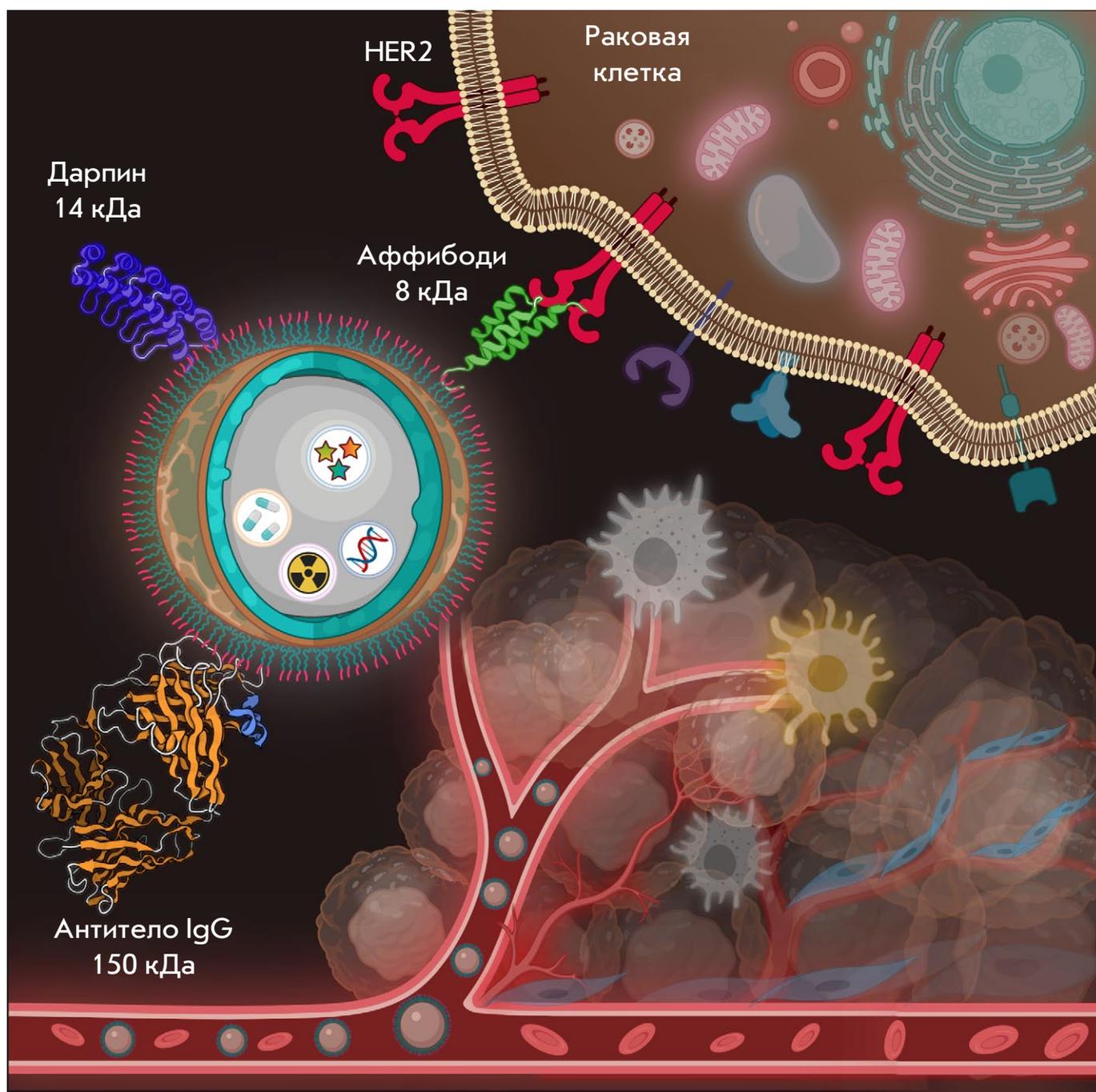


Рис. 1. Наночастицы как платформа для создания средств тераностики. На схеме представлена наночастица «ядро–оболочка», служащая матрицей для загрузки как диагностических (флуоресцентных или радиоактивных), так и терапевтических соединений (химиотерапевтические вещества, гены). Поверхность наночастицы модифицируют различными направляющими соединениями: традиционно с этой целью применяют антитела (IgG, 150 кДа) либо скаффолдовые полипептиды – дарпины (14 кДа) или аффибоды (8 кДа). Представлены наноструктуры, нацеленные на онкомаркер HER2, сверхэкспрессирующийся на поверхности клеток рака молочной железы человека. Рисунок создан в Biorender.com

Основные представители скаффолдовых (каркасных) белков – миметиков антител

Белки	Основа белков – скаффолд (каркас)	Молекулярная масса, кДа	Репрезентативные источники
Авимеры	Домен А внеклеточных рецепторов	4	[17, 18]
Адгироны	Домен фитоцистатина	10	[19]
Аднектины (монободы)	FN3-домен фибронектина	10	[20–22]
Атримеры	Домен CTLD тетранектина	60–70	[23]
Антикалины	Домены липокалина	20	[24, 25]
Аффибоды	Z-домен белка А клеточной стенки золотистого стафилококка	6	[26]
Аффилины	Домены гамма-В-кристаллина / убиквитина	20 /10	[27, 28]
Аффимеры	Домены цистатина – ингибитора цистеиновых протеаз	12	[29, 30]
Аффитины (нанофитины)	Домены ДНК-связывающего белка Sac7d	7	[31–33]
Дарпины	Анкириновый повтор белка дрозофилы	14–18	[34–37]
Кноттины	Богатые дисульфидами пептидные токсины	3	[38]
Ободы	Домен распознавания антикодона из аспартил-тРНК-синтазы	10	[39]
Полипептиды на основе домена Кунитца	Домен Кунитца сериновых протеаз	6	[40]
Пронектины	14 домен фибронектина человека	75	[41]
Репебоды	Лейцин-богатые повторы вариабельных рецепторов лимфоцитов	3–30	[42]
Финомеры	SH3-домен киназы Fyn (src-гомологичные домены)	7	[43]
Центирины	Fn3-домены тенасцина-С	9	[44]
ADAPT (ABD-Derived Affinity Proteins)	Альбуминсвязывающий домен белка G	5	[45]
NanoCLAMP (nano-Clostridial Antibody Mimetic Proteins)	Углеводсвязывающий домен гиалуронидазы С	16	[46]
ARM (Armadillo Repeat Proteins)	Белки с доменом Armadillo дрозофилы	39	[47]
PDZ-белки	Домены PSD-95/Discs-large/ZO-1	10	[48]

2. ОСНОВНЫЕ СТРУКТУРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СКАФФОЛДОВЫХ БЕЛКОВ И ИХ ПРЕИМУЩЕСТВА ПЕРЕД ПОЛНОРАЗМЕРНЫМИ АНТИТЕЛАМИ

Гибридная технология получения моноклональных антител, описанная Георгом Кёлером и Сезаром Мильштейном и удостоенная Нобелевской премии по физиологии и медицине за 1984 год, позволила значительно преуспеть в реализации концепции «магической пули». Эта концепция, сформулированная Паулем Эрлихом, заключается в создании эффективного способа доставки терапевтического средства только к очагу болезни без воздействия на здоровые ткани и без развития нежелательных побочных эффектов. На сегодняшний день более восьми десятков антител уже прошли клинические испытания и одобрены для использования в клинике. Однако даже эти антитела вызывают целый спектр нежелательных эффектов, что привело к интенсивному развитию направления синтетической биологии,

посвященного созданию скаффолдовых распознающих белков.

За последние 20 лет во многом благодаря технологии синтетических библиотек получены разнообразные каркасные распознающие белки. Как и антитела, эти белки имеют консервативную каркасную часть и вариабельную распознающую часть. Специфически связывающие скаффолдовые белки обычно получают с помощью комбинаторных библиотек, которые содержат наборы генов, различающихся в вариабельной области. В частности, разрабатывают белки на основе доменов липокалинов, цинковых пальцев, src-гомологичных доменов, PDZ-доменов, доменов ингибиторов сериновых протеаз типа Кунитца, цистатинов, ДНК-связывающего белка Sac7d, А-доменов различных мембранных рецепторов, доменов гамма-В-кристаллина и убиквитина, а также ряда других. На сегодняшний день создано более 20 классов миметиков антител, основные представители которых представлены в *таблице*.

Представленные белки обладают малым размером (8–20 кДа), высокой аффинностью к молекулярным мишеням (субнано–фемтомолярные значения константы связывания) и оптимальными биохимическими и термодинамическими характеристиками. Они остаются долгое время стабильными при воздействии высоких температур (вплоть до 80°C), при низких значениях pH (вплоть до pH 2) и действии хаотропных агентов. Введение цистеинов в состав этих белков позволяет получать как димеры с заданными характеристиками, так и проводить региоселективную модификацию белков различными соединениями посредством образования дисульфидных связей. Низкая иммуногенность белков, вызванная их синтетической природой, позволяет использовать их в терапевтических целях, особенно в тех случаях, когда одного курса терапии недостаточно для достижения ремиссии и существует необходимость в проведении повторных инъекций препарата.

Все классы данных белков имеют свободные (вне распознающей области) N- и C-концы, что позволяет проводить эффективную химическую конъюгацию белков с полимерами на поверхности наночастиц, а также создавать генно-инженерные конструкции (например, слитые белки, состоящие из скаффолдов и белковых токсинов) для терапевтических применений. Малый размер скаффолдов позволяет значительно увеличить количество их молекул, прикрепляемых к поверхности наночастиц, по сравнению с IgG. На сегодняшний день для доставки наночастиц к молекулярным мишеням наиболее часто используют только дарпины, аффибоды и производные альбуминсвязывающего домена (ABD) (рис. 2). Также проведен ряд исследований, направленных на создание наночастиц для адресной доставки на основе репеды [49–51], аффимеров [52], аффитинов [53–55] и кноттинов [56].

3. ДАРПИНЫ КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ НАНОЧАСТИЦ К МИШЕНЯМ

Дарпины (DARPin, Designed Ankyrin Repeat Protein), или белки с анкириновыми повторами – уникальные инструменты для задач персонализированной медицины и фундаментальных исследований в области молекулярной и клеточной биологии [57, 58]. В основе этих белков лежат анкириновые повторы – серия плотно упакованных повторов, каждый из которых состоит примерно из 33 аминокислотных остатков. В свою очередь, каждый повтор состоит из двух альфа-спиралей, связанных короткой петлей, и одного бета-поворота, связывающего данный повтор со следующим. Белки с анкириновыми повторами образуют правозакрученный

соленоид, в котором имеется протяженный гидрофобный остов и гидрофильная поверхность, доступная растворителю [59]. Они часто опосредуют белок-белковые взаимодействия внутри клетки, например, в качестве белков цитоскелета, инициаторов транскрипции или регуляторов клеточного цикла. В природе обычно встречаются белки с четырьмя–шестью повторами, но иногда число повторов больше 29. Семь аминокислотных остатков из повтора (шесть из бета-поворота и один из спирали) формируют связывающую поверхность; при создании рекомбинантных библиотек в кодоны именно этих остатков вводят случайные замены. Дарпины часто отбирают с применением технологии рибосомного дисплея. Дарпины, как правило, формируют из двух-трех повторов (иногда четырех), последовательно расположенных между N- и C-концами. Молекулярная масса таких каркасных белков зависит от количества повторов и составляет 14–18 кДа, если состоит из двух-трех повторов. Дарпины являются чрезвычайно термостабильными белками, выдерживающими достаточно суровые условия – нагревание до 90°C, действие протеаз и хаотропных агентов. Получены дарпины к мембраноассоциированным онкомаркерам: EpCAM, VEGF-A, HER2, а также к мальтозосвязывающему белку, MAP-киназе, каспазе-2, антителу IgE, а также CD4 [35, 60–62].

Поскольку дарпины формируют достаточно жесткий каркас и распознающую поверхность, при распознавании мишени часто возникают проблемы стерического характера. Для решения этой проблемы разработан новый схожий класс соединений – LoopDARPin с мягкими выступающими распознающими петлями, которые не нарушают структуру самого каркасного белка [63].

3.1. Комплексы магнитных наноструктур с дарпинами для направленной доставки

В цикле работ [64–68] продемонстрирована успешная модификация магнитных наноструктур, представленных суперпарамагнитными наночастицами оксида железа, молекулами DARPin G3 и DARPin 9_29 [69], селективно распознающими клинически значимый онкомаркер HER2 – рецептор эпидермального фактора роста 2 человека. DARPin_G3 связывается с доменом IV рецептора HER2 (расположенного наиболее близко к мембране) с $K = 0.070$ нМ [61], а DARPin_9.29 – с доменом I рецептора HER2 (наиболее отдаленного от мембраны) с $K = 3.8$ нМ [34].

Ген *ERBB2*, кодирующий HER2, играет важную роль в развитии злокачественных опухолей человека. Этот ген амплифицирован примерно в 20–30% случаях рака молочной железы и во многих других

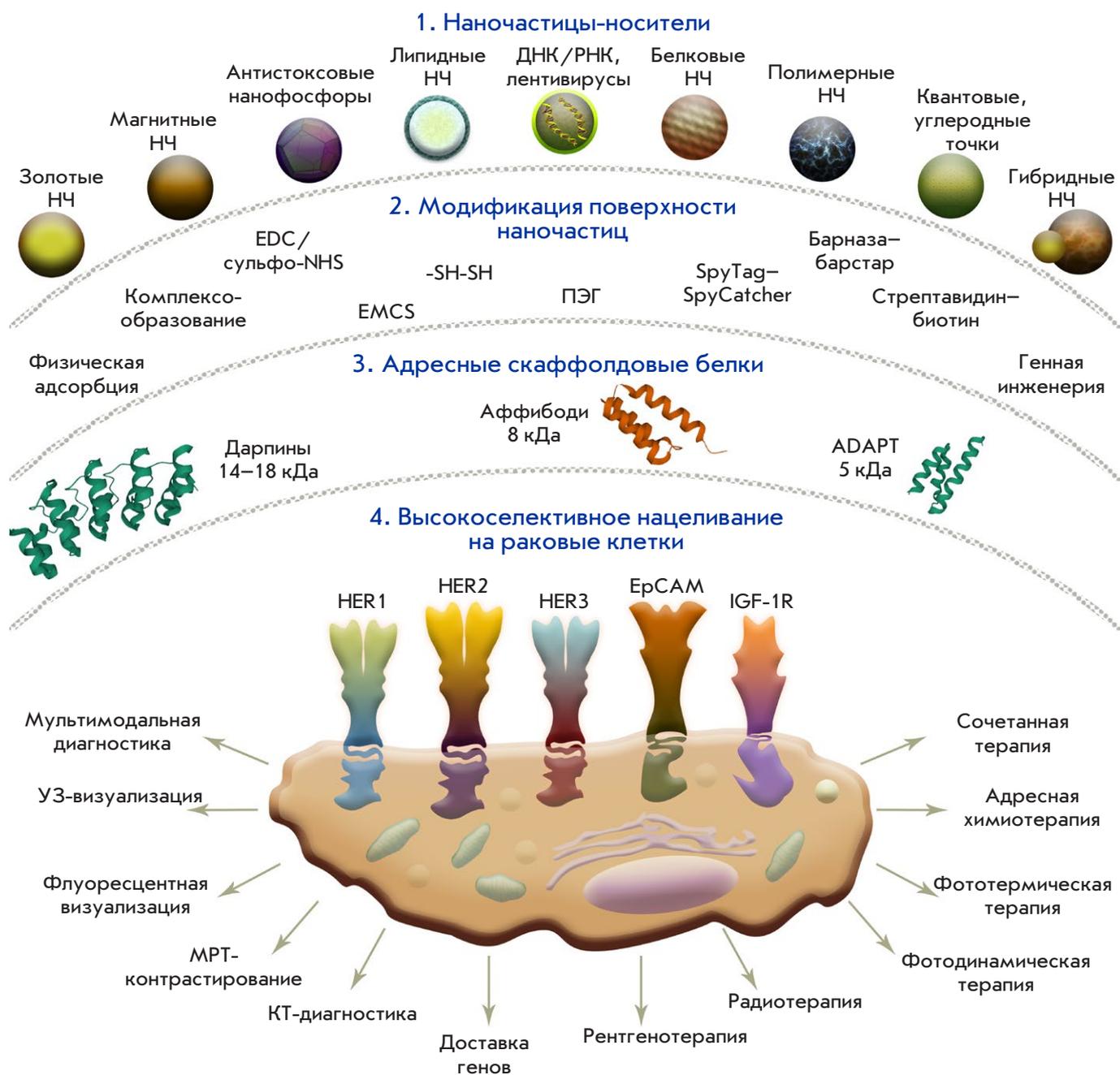


Рис. 2. Адресные скаффолдовые полипептиды для доставки наночастиц-носителей к клеткам-мишеням. **1.** – Широкое разнообразие наночастиц, используемых для диагностических и терапевтических задач. **2.** – Средства модификации поверхности наночастиц нацеливающими молекулами: физическая адсорбция молекул, химические методы конъюгации, белковые адапторные системы, генно-инженерные методы. **3.** – Адресные скаффолдовые белки, уже используемые для адресной доставки наночастиц – дарпины, аффибоды и ADAPT. **4.** – Задачи, решаемые при адресной доставке наночастиц к рецепторам раковых клеток: диагностика, в том числе мультимодальная, и терапия, в том числе сочетанная

типах злокачественных опухолей. Сверхэкспрессия рецептора HER2 часто коррелирует с высоким метастатическим потенциалом опухоли, устойчивостью к химиотерапии, а также предсказывает высокий

риск рецидива болезни и снижение общей выживаемости пациентов.

Молекула HER2 уже используется как мишень для адресной терапии рака молочной железы и же-

лудка с использованием гуманизированных анти-HER2-антител: трастузумаба (Herceptin, Herclon) и пертузумаба (Perjeta, Omnitarg) [70, 71]. К сожалению, механизмов, связанных с привлечением к раковым клеткам молекулы комплемента и цитотоксических лейкоцитов, недостаточно, чтобы полностью элиминировать опухоль, что требует создания адресных агентов, содержащих дополнительные токсичные соединения. Так, при HER2-положительном раке молочной железы и желудка применяется трастузумаб, конъюгированный с ингибитором сборки микротрубочек (трастузумаб-эмантанзин, Кадсила), который действительно повышает эффективность терапии HER2-положительных опухолей.

Существует острая необходимость в новых, более эффективных методах тераностики данного заболевания. Наночастицы, обладающие диагностическими и терапевтическими свойствами, направленные на рецептор HER2, представляются одними из наиболее перспективных инструментов для разработки новых стратегий терапии опухолей.

Магнитные наночастицы с дарпинами DARPIn G3 и DARPIn 9_29 показали свою эффективность для тераностики HER2-положительных опухолей. Так, методом химической конъюгации получены комплексы магнитных наночастиц–DARPIn G3, направленных на HER2 на поверхности линии клеток SK-BR-3, аденокарциномы молочной железы человека. В результате стали возможными флуоресцентная и магниторезонансная визуализация HER2-сверхэкспрессирующих опухолей *in vivo* [64].

Использование химической конъюгации дарпина DARPIn 9_29 с магнитными частицами не позволило добиться селективного связывания наночастиц с клетками-мишенями [67, 68]. Видимо, при прямой конъюгации молекул малого размера с поверхностью наночастиц возникают такие проблемы, как 1) частичная денатурация белка на поверхности наночастицы, 2) связывание посредством нескольких аминокислотных групп и неориентированное присоединение, 3) стерические затруднения при распознавании мишени. Эти проблемы решены с помощью белковых адапторных систем. В частности, в качестве посредника между поверхностью наночастиц и молекулой дарпина использовали высокоаффинную белковую пару барназа–барстар.

Пара барназа–барстар является уникальным инструментом для создания мультифункциональных средств биомедицины [72–74]. Барстар (10 кДа) – природный ингибитор бактериальной рибонуклеазы барназы (12 кДа). Эти белки обладают исключительно высокой аффинностью (константа ассоциации $K_{ac} \sim 10^{14} \text{ M}^{-1}$) и быстрой кинетикой взаимодей-

ствия (константа скорости образования комплекса $k_{on} \sim 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), а их отсутствие в клетках млекопитающих позволяет использовать эти белки в кровотоке без возможных проблем, связанных с конкурентным связыванием с эндогенными компонентами крови. Небольшой размер и высокая константа ассоциации делают их идеальным «молекулярным клеем» для создания различных самособирающихся структур на основе различных модулей, где в состав одного модуля (например, терапевтического) входит один компонент системы (например, барстар), а в состав другого (например, дарпин) – другой (например, барназа). Подобный «лего»-подход позволяет избежать таких стандартных проблем химической конъюгации компонентов с наноструктурами и делает возможным получение биологически активных структур путем простого смешивания компонентов, например: наночастица–барстар + барназа–дарпин.

В частности, разработан новый универсальный метод биомодификации наноструктур различной природы, заключающийся в использовании пептидов, связывающих твердую фазу, и белкового модуля барназа–барстар [68]. Метод включает нековалентную модификацию поверхности наночастиц пептидом, связывающим SiO_2 -поверхность наночастиц ($\text{VKTQATSREEPPRLPSKHPG}_4\text{VKTQAS}$ (silica binding peptide, SBP), генно-инженерно слитого с барстаром (SBP-Bs). Эффективность предложенного метода подтверждена получением флуоресцентных и магнитных наночастиц, модифицированных дарпином DARPIn 9_29, распознающим онкомаркер HER2, и адресной доставкой данных наночастиц к раковым клеткам со сверхэкспрессией HER2. Для реализации этого подхода получены и охарактеризованы слитые белки, состоящие из SiO_2 -связывающего полипептида и барстара (SBP-Bs), а также DARPIn 9_29 и барназы (DARPIn 9_29-Bn). В обоих белках функциональные модули связаны гибким пептидным линкером для сохранения функциональной активности, устойчивым к действию протеаз. Адресные наночастицы получали путем самосборки двух компонентов – наночастиц с барстаром и адресного дарпина с барназой. Для распознавания мишени – рецептора HER2 на поверхности клеток – такой подход оказался гораздо эффективнее химической конъюгации.

Этот подход обладает универсальностью: можно легко заменять компоненты адапторной системы, содержащие как барназу, так и барстар. Описано 12 способов адресной доставки наночастиц, различным образом модифицированных адресными полипептидами через барназу–барстар [68]. В качестве полипептида, опосредующего связь белка адапторной системы барназа–барстар с поверхно-

стью наночастицы, использовали также С-концевой фрагмент белка Mms6 – одного из белков оболочки магнитосом магнитотактических бактерий [67]. Самособранные конструкции на основе наночастиц магнетита МС–Bs–С–Mms6–DARP 9_29–Bn использовали для адресной доставки к сверхэкспрессирующим HER2 клеткам SK-BR-3. Показано, что такие конструкции эффективны для селективного мечения и визуализации HER2-положительных клеток *in vitro* [65, 67].

3.2. Модификация золотых наноструктур дарпинами

У наноразмерных объектов появляются необычные квантово-химические свойства, отличные от свойств массивных образцов, которые позволяют создавать multifunctionальные средства терапии и диагностики [75–78]. Одно из таких интересных свойств – эффект локализованного поверхностно-плазмонного резонанса (ЛППР) у наноструктур золота и серебра, а также у гибридных наноструктур (например, типа ядро/оболочка).

Явление ЛППР основано на резонансном возбуждении плазмонов – квазичастиц, представляющих собой кванты колебаний свободных электронов на границе раздела двух фаз с различающимися показателями преломления при соблюдении условия полного внутреннего отражения. Если выполнены условия ЛППР, то интенсивность отраженного света резко уменьшается в связи с переходом энергии падающей электромагнитной волны в энергию плазмона. Поглощенная энергия может переходить в тепловую, реализуя тем самым гипертермические свойства образца с ЛППР, которые могут применяться в терапии опухолей, клетки которых обладают повышенной чувствительностью к нагреванию.

Фундаментальные исследования направлены на изучение свойств наноструктур с ЛППР в основном из золота и серебра, а также из других менее традиционных материалов, таких, как алюминий, медь, палладий, платина. В частности, получены наночастицы золота размером 5 нм, модифицированные DARP 9_29 [79]. Нековалентная стабилизация непокрытых наночастиц золота молекулами DARP 9_29 позволила получить коллоидно стабильные комплексы с адресными молекулами, селективно распознающими поверхность раковых клеток, экспрессирующих рецептор HER2. Схожий метод модификации использован для получения золотых наностержней длиной 50 нм и диаметром 7 нм для адресной доставки к HER2-положительным клеткам *in vitro* и их селективного уничтожения посредством фототермически индуцированной локальной гипертермии при возбуждении светом с длиной

волны 850 нм и мощностью 30 мВт/см² в течение 20 мин [80]. Эффективность разработанных адресных наностержней для локальной гипертермии подтверждается практически 100% гибелью только HER2-сверхэкспрессирующих клеток при облучении светом, в то время как необлученные клетки и клетки с незначительной экспрессией HER2 остаются полностью жизнеспособными.

3.3. Модификация апконверсионных наноструктур дарпинами

Апконверсионные наноструктуры (антистоксовые нанофосфоры) – фотолюминесцентные наночастицы, преобразующие электромагнитное излучение с более низкой энергией (большой длины волны) в электромагнитное излучение с большей энергией (меньшей длиной волны) [81–85]. Антистоксовые нанофосфоры представляют собой кристаллы NaYF₄, легированные редкоземельными элементами, а именно Yb³⁺, Er³⁺, Tm³⁺. Такие наноструктуры поглощают несколько низкоэнергетичных фотонов и переиспускают один более высокоэнергетичный фотон, реализуя тем самым явление апконверсии, когда длина волны испускаемого сдвигается в более коротковолновую область (синий сдвиг, антистоксов сдвиг), в то время как в большинстве процессов флуоресценции в живых системах реализуется стоксов сдвиг (красный сдвиг). Нанофосфоры синтезируют таким образом, чтобы возбуждение происходило в окне прозрачности биоткани (около 980 нм), а испускание – в коротковолновом диапазоне, подходящем для большинства визуализирующих устройств для работы с живыми объектами *in vitro* и *in vivo*. Антистоксовые нанофосфоры служат прекрасными метками для визуализации *in vivo*, поскольку благодаря длительной фотолюминесценции и разрешенной по времени регистрации сигнала существует возможность полностью исключить аутофлуоресценцию биоткани и получить истинный сигнал без шума с высокой чувствительностью, вплоть до регистрации одиночной частицы.

Нанофосфоры состава ядро/оболочка = NaYF₄:Yb,Er,Tm/NaYF₄, были покрыты анти-HER2 дарпином DARP_{in} 9_29 и использованы для адресной доставки к HER2-положительным раковым клеткам в культуре и визуализации ксенотрансплантатов опухоли у животных в течение как минимум 24 ч. Проведено исчерпывающее доклиническое исследование общей и специфической токсичности таких наноструктур, включая оценку их аллергенных, иммунотоксических и репротоксических свойств. Полученные экспериментальные данные позволяют сделать вывод о том, что как безадресные, так и адресные нанофосфоры являются

функциональными, нецитотоксичными, биосовместимыми и безопасными для визуализации клеток *in vitro* и опухолей *in vivo* [86–88].

С целью придания нанофосфорам дополнительной терапевтической модальности их поверхность модифицировали белком DARPin 9_29, слитым генно-инженерными методами с низкоиммуногенным фрагментом псевдомонадного экзотоксина А – LoPE [89]. Полученный белок DARPin-LoPE обладает всеми необходимыми для тераностики свойствами – адресным взаимодействием с клетками-мишенями и цитотоксичностью при связывании с клетками.

Экзотоксин А синегнойной палочки *Pseudomonas aeruginosa* (PE, ETA) – один из наиболее эффективных индукторов апоптоза за счет ферментативной активности, угнетающей трансляцию. PE состоит из трех доменов – домен I отвечает за связывание и проникновение токсина в клетку, домен II участвует во внутриклеточном транспорте токсина, домен III обладает собственной ферментативной активностью – ADP-рибозилирует эукариотический eEF2, блокируя тем самым биосинтез белка в клетке, что в итоге приводит к ее гибели [90]. Для создания эффективных иммунотоксинов на основе PE используют укороченные варианты данного токсина, а именно, непосредственно каталитический домен, соединенный с направляющими модулями различной специфичности. Получены иммунотоксины на основе дарпинов, узнающих HER2, соединенные с одним из вариантов С-концевого (эффекторного) фрагмента PE (LoPE), в составе которого мутированы иммунодоминантные эпитопы В-лимфоцитов человека [91]. Иммуногенность и системная токсичность такого фрагмента ниже, чем у немодифицированного фрагмента.

Адресный цитотоксичный белок – иммунотоксин DARPin-LoPE, конъюгировали с поверхностью антистоксовых нанофосфоров с помощью карбодиимида и промежуточного линкера – полиэтиленгликоля. Изначально синтезированные нанофосфоры были покрыты ПМАО – чередующимся сополимером малеинового ангидрида с 1-октадеценом, и для придания большей коллоидной стабильности – полиэтиленгликолем [89]. Цитотоксичность адресных комплексов нанофосфор–ПЭГ–DARPin-LoPE изучена на клетках SK-BR-3-Kat. Значение IC50 таких комплексов равно 0.4 мкг/мл, а в контрольных клетках CHO, не экспрессирующих HER2, IC50 = 200 мкг/мл, что подтверждает адресную цитотоксичность полученных соединений.

Адресная цитотоксичность значительно усиливалась при использовании иттрия-90 как бета-эмиттера в составе нанофосфоров. Синтезированы радиоактивные антистоксовые нанофосфоры с бе-

та-излучателем (время полураспада которого составляет 63 ч, что оптимально для биомедицины) и модифицированные белком слияния DARPin 9_29 с фрагментом псевдомонадного экзотоксина А, PE [92]. Объединение двух терапевтических модальностей в составе одной наночастицы приводит к сильному синергическому действию: IC50 составило 5.2 мкг/мл для адресных наночастиц, 140 мкг/мл для наночастиц, допированных иттрием-90, в случае наночастиц с адресным модулем и иттрием-90 наблюдали существенное снижение полумаксимальной ингибирующей концентрации: IC50 = 0.0024 мкг/мл [92].

3.4. Комплексы липидных наноструктур и дарпинов

В качестве объектов исследований для задач онкотераностики использовали такие липидные структуры, как однослойные липосомы и экзосомы.

Получены липосомы размером 117 ± 41 нм, загруженные РНКазой – барназой, и химически конъюгированные с анти-HER2 дарпином 9_29 [93, 94]. РНКазы представляют интерес как немутагенная альтернатива стандартным химиотерапевтическим препаратам. Однако многие РНКазы млекопитающих не являются сильнодействующими токсинами, поскольку их существенно подавляет ингибитор рибонуклеазы, присутствующий в цитоплазме клеток млекопитающих. Рибонуклеаза барназа выгодно отличается тем, что она не обладает мутагенной активностью, не вызывает сильных побочных токсических эффектов и, проникнув в клетку, расщепляет РНК, вызывает ее гибель. Активность барназы не подавляется человеческим ингибитором рибонуклеаз. Барназа вызывает деграцию РНК с низкой молекулярной массой, а именно тРНК и 5.8S рРНК (но не 5S рРНК). При интернализации барназа вызывает блеббинг клеточных мембран и апоптоз путем межнуклеосомного расщепления хроматина. С использованием липосом, загруженных барназой и модифицированных анти-HER2 дарпином, установлена эффективность терапии HER2-положительных ксенорафтных опухолей BT474 у лабораторных животных. IC50 барназы в составе адресных липосом составила 0.11 нМ для клеток BT474 в культуре *in vitro*, эффективность ингибирования опухолевого роста *in vivo* составила 84%. Комбинирование адресных липосом с адресным иммунотоксином на основе LoPE и дарпина EC1 привело к подавлению опухолевого роста на 91.8% и полному предотвращению появления метастазов [94].

DARPin EC1 связывается с рецептором ErbB3 с пиколярной аффинностью ($K_d = 68$ пМ). ErbB3 – трансмембранный гликопротеин с моле-

кулярной массой 40 кДа, состоящий из 314 аминокислотных остатков, впервые обнаружили как опухолевый антиген в клетках рака толстой кишки в 1979 году. Основная функция ЕрСАМ заключается в обеспечении межклеточного взаимодействия. Молекула ЕрСАМ также часто экспрессируется на клетках рака молочной железы человека, что ассоциировано с плохим прогнозом. Так, по результатам обширного исследования экспрессия ЕрСАМ обнаруживается в 48% случаев рака молочной железы человека [95]. При этом, как и HER2, ЕрСАМ уже применяют в качестве мишени при иммунотерапии моноклональными антителами (препаратом Ремоваб). В связи с этим, перспективным представляется комбинирование различных методов воздействия на злокачественные опухоли с помощью скаффолдовых белков, направленных как на HER2, так и на ЕрСАМ, для разработки эффективных стратегий терапии опухолей.

Наряду с липосомами, загруженными барназой, получены 90-нм липосомы, загруженные PE40 и модифицированные DARP 9_29 [96]. Эти липосомы использовали для селективного уничтожения HER2-сверхэкспрессирующих клеток ($IC_{50} = 0.17$ нМ для клеток SK-BR-3 и 0.21 нМ для клеток SK-OV-3) [96].

Изящным подходом к созданию адресных липидных наночастиц является использование природных механизмов получения уже модифицированных наночастиц, не требующих применения методов химической конъюгации. В частности, описано получение экзосом из клеток НЕК293Т, трансдуцированных лентивирусом со вставкой гена дарпина DARP G3, распознающего рецептор HER2 [97]. Такие экзосомы специфично связывались с клетками SK-BR-3 и адресно доставляли малые интерферирующие РНК против гена *TPD52*, что приводило к подавлению экспрессии гена на 70% [97].

3.5. Доставка нуклеиновых кислот с использованием дарпинов

Показано, что дарпины могут применяться для адресной доставки генного материала в клетки эукариот. Получены лентивирусы, экспонирующие дарпины DARP G3, DARP H14R, DARP 9_29, DARP 9_26, DARP 9_16, DARP 9_01 на своей поверхности, нацеленные на рецептор HER2 [98]. При этом DARPin 9_29 оказался наиболее эффективным как по представленности на поверхности вируса, так и по трансдукции HER2-положительных клеток. Дарпины оказались эффективнее ранее используемого мини-антитела scFv – одноцепочечного фрагмента легкой и тяжелой цепи иммуноглобулина 4D5, направленного на рецептор HER2 [98].

Дарпины использовали для доставки малых интерферирующих РНК, комплементарных мРНК регулятора апоптоза Bcl-2 [99]. Применяли димеры дарпина ЕС1, слитые с протамином-1 – небольшим белком, формирующим комплекс с нуклеиновыми кислотами. Такой белок связывал четыре-пять молекул малых интерферирующих РНК и сохранял специфичность связывания с рецептором ЕрСАМ на поверхности клеток MCF-7. Это позволило адресно трансфицировать только ЕрСАМ-сверхэкспрессирующие раковые клетки и добиться эффективного подавления биосинтеза Bcl-2 [98].

4. АФФИБОДИ КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ НАНОЧАСТИЦ К МИШЕНЯМ

Аффибоды содержат Z-домен белка А золотистого стафилококка *Staphylococcus aureus*, состоящий из 58 аминокислотных остатков, формирующих три α -спирали, образующих бочонок. Аффибоды выдерживают действие высоких температур (около 90°C), они устойчивы к протеолизу, а также к кислотным и щелочным условиям (рН от 2.5 до 11). В настоящее время получен спектр аффибоды к целому ряду молекулярных мишеней: рецепторам HER1, HER2, к TNF- α . Наиболее интенсивно изучают аффибоды $Z_{HER2:342}$ (известное также, как АВУ-002), распознающее рецептор HER2 с $K_d = 22$ пМ [26]. Аффибоды $Z_{HER2:342}$ связывается с субдоменом I рецептора HER2, не конкурируя с другими соединениями, направленными на HER2 – антителами трастузумабом или пертузумабом, что открывает широкие возможности в тераностике онкологических заболеваний.

4.1. Модификация магнитных наноструктур аффибоды

Аффибоды – одни из наиболее эффективных каркасных белков, используемых для нацеливания наночастиц на клетки эукариот. Проведено сравнительное исследование эффективности различных анти-HER2 нацеливающих молекул для доставки магнитных наночастиц размером 25 нм, стабилизированных карбоксиметилдекстраном, к HER2-положительным клеткам [66]. Именно наночастицы, модифицированные аффибоды, наиболее пригодны как для магнитной детекции, так и для флуоресцентной визуализации клеток с использованием наночастиц. Это обусловлено малым размером аффибоды $Z_{HER2:342}$ (8 кДа) по сравнению с другими молекулами – дарпином DARP G3 (14 кДа) и антителом трастузумаб (150 кДа), что позволяет присоединять большее количество активных молекул к поверхности наночастиц [66].

Эффективность аффибоды подтверждается результатами, полученными в большом количестве фундаментальных работ [100, 101]. Для визуализации и магнитно-резонансного контрастирования EGFR- и HER2-положительных клеток *in vitro* и *in vivo* создан набор частиц. Получены 27-нм суперпарамагнитные наночастицы оксида железа, допированные лантаноидами для мультиплексного анализа связывания наночастиц с клетками методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой. К таким наночастицам методом безмедной клик-химии присоединяли анти-HER2-аффибоды [102].

Реакции, относящиеся к клик-химии (биортогональные реакции), имеют исключительно высокий выход, они региоселективны и протекают в различных условиях, в том числе в физиологических. Одна из наиболее часто используемых клик-реакций – азид-алкиновое циклоприсоединение с использованием меди (I) в качестве катализатора [103–105]. Поскольку азидные и алкиновые группы в белковых молекулах, как правило, не представлены, введение этих групп в конъюгируемые компоненты и использование данной реакции позволяют осуществлять полный контроль над селективностью и эффективностью конъюгации.

Суперпарамагнитные 7-нм наночастицы (СПИО) в составе 50-нм микроэмульсий, сформированных посредством амфифильных красителей (в том числе фотосенсибилизаторов) – индоцианинового зеленого (ICG) и протопорфирина IX (PpIX), использовали для адресной доставки *in vitro* [106]. СПИО 30 нм, модифицированные анти-HER2-аффибоды методом клик-химии, использовали для магнитно-резонансного контрастирования T6–17 HER2-сверхэкспрессирующих опухолей [107]. При этом количество молекул аффибоды, присоединяемых к наночастицам, должно быть оптимальным для распознавания мишени и достижения максимального МРТ-контраста. Так, определение количества молекул аффибоды на поверхности наночастиц после клик-реакции показало, что наиболее эффективны наночастицы 30 нм СПИО, несущие на поверхности 23 молекулы анти-HER2-аффибоды (в тестируемом диапазоне от 6 до 36 молекул) [108].

Мультифункциональность магнитных наноструктур использовали также для тримодальной визуализации 24-нм гетероструктурами, состоящими из наночастиц оксида железа Fe_3O_4 и золота, и хелатированных ^{64}Cu . С помощью наночастиц, конъюгированных с анти-EGFR-аффибоды $Z_{EGFR:1907}$ карбодиимидным методом, проведена оптическая, ПЭТ и МРТ-визуализация EGFR-сверхэкспрессирующих опухолей у лабораторных животных [109]. Также осуществлена тримодальная визуализация опухо-

лей с применением компьютерной томографии, ультразвуковой детекции и МРТ-визуализации. С этой целью использовали 10-нм магнитные наночастицы, конъюгированные с анти-HER2-аффибоды $Z_{HER2:342}$ и меченные ближним ИК-красителем NIR-830 [110, 111]. Впоследствии эти частицы, загруженные цисплатином, использовали для фототермически-индуцированной терапии HER2-положительных опухолей *in vivo* [112].

Магнитные частицы, модифицированные аффибоды $Z_{IGF1R:4551}$ (распознающим IGF-1R), использовали как для МРТ-контрастирования, так и для фотоиндуцированной гипертермии опухолей SW620 при облучении светом с длиной волны 808 нм [113].

4.2. Модификация золотых наноструктур аффибоды

Наночастицы золота (140 нм), покрытые оболочкой кремния, модифицированные анти-EGFR-аффибоды $Z_{EGFR:1907}$ через гетеробифункциональное малеимидное производное ПЭГ, использовали для селективного мечения EGFR-сверхэкспрессирующих клеток в культуре и визуализации опухолей *ex vivo* [114]. Комплексы наночастицы–клетки выявляли с использованием как флуоресцентной микроскопии, так и с помощью поверхностно-усиленной рамановской спектроскопии [114]. Показано, что такие наночастицы обладают слабой токсичностью для здоровых мышей, что подтверждено определением биохимических показателей, иммуногистохимическим анализом, измерением сердечных параметров в течение 2 недель после системного введения наночастиц [115]. В ряде исследований созданы адресные наночастицы золота для диагностики [110, 116] и терапии HER2-сверхэкспрессирующих опухолей [112, 117].

Наряду со способностью усиливать контраст в рамановской спектроскопии, наночастицы золота являются эффективными сенсоризаторами рентгеновского излучения. С использованием карбодиимидного метода получены 56-нм наночастицы золота, покрытые анти-HER2-аффибоды [118]. При воздействии рентгеновского излучения (в дозе 10 Гр) такие частицы обладают HER2-специфичной цитотоксичностью, при этом наиболее чувствительными среди тестируемых клеточных линий (SK-BR-3, SK-OV-3, HN-5, MCF-7) оказались HER2-положительные клетки SK-OV-3, выживаемость которых под действием адресных наночастиц и рентгеновского излучения снижалась на 63% [118].

Для достижения максимальной эффективности диагностики (тримодальная визуализация) и терапии (фотоиндуцированной гипертермии опухоли) синтезированы 12-нм янус-частицы состава Au- Fe_2O_3 .

Эти частицы были покрыты анти-HER2-аффибоди $Z_{\text{HER2:342}}$ и использованы для тримодальной детекции опухоли *in vivo*: МРТ-визуализации, фотоакустической томографии и компьютерной томографии, и для 808-нм индуцированной гипертермии раковых клеток *in vivo* на моделях ксенотрансплантатов со сверхэкспрессией рецептора HER2 [119].

Более изящный подход к получению наночастиц с узким распределением по размеру разработан на основе белковых наночастиц, формируемых капсидом вируса гепатита В, экспонирующего на своей поверхности молекулы аффибоди. Проводили восстановление золота, которое приводило к формированию 1–3-нм золотых наночастиц на поверхности уже полученных вирусных частиц. Такие гетероструктуры размером 40 нм, специфичные к EGFR, эффективны как для визуализации раковых клеток посредством Cy5.5 метки, так и для воздействия гипертермии на клетки опухолевой линии MDA-MB-468 сверхэкспрессирующих EGFR [120].

4.3. Модификация антистоксовых наноструктур аффибоди

Апконверсионные наночастицы являются эффективными диагностическими средствами. Они позволяют визуализировать биологические объекты без значительного влияния аутофлуоресценции с высокой чувствительностью [121]. Получены наночастицы состава $\text{NaYF}_4:\text{Tm}^{+3}, \text{Yb}^{+3}$, ковалентно модифицированные анти-EGFR-аффибоди, для визуализации EGFR-экспрессирующих опухолей *in vivo* [122]. Для фотодинамической терапии EGFR-сверхэкспрессирующих опухолей синтезированы апконверсионные наночастицы с более сложной архитектурой [123]. Получены комплексные суперструктуры с апконвертирующим ядром состава $\text{NaYF}_4, \text{Yb}, \text{Er}$, окруженным металл-органическими каркасными структурами на основе цинка. Самосборку таких структур осуществляли с использованием комплементарных цепей ДНК. При возбуждении таких структур внешним ИК-светом апконверсионное ядро испускает свет видимого диапазона, тем самым возбуждая металл-органические каркасы, способные продуцировать активные формы кислорода, выступая таким образом в качестве терапевтических соединений [123].

4.4. Аффисомы

Соединения на основе липосом, модифицированных аффибоди, получили название аффисом [124, 125]. Для терапии HER2- и EGFR-положительных опухолей получен ряд липосом, ковалентно модифицированных анти-HER2-аффибоди $Z_{\text{HER2:342}}$ [126], а также через полиэтиленгликолевый линкер: анти-HER2-

аффибоди $Z_{\text{HER2:477}}$ [124], $(Z_{00477})_2$ -Cys [127] и анти-EGFR-аффибоди $(Z_{\text{EGFR:955}})_2$ [128].

4.5. Комплексы полимерных наноструктур и аффибоди

Для синтеза наночастиц используются разнообразные материалы (золото, углерод, магнетит, кремний и др.), среди которых по структурным и функциональным характеристикам выделяются биосовместимые полимеры, например, уже применяемый в диагностике и терапии полилактид-когликолид (PLGA). PLGA постепенно разлагается до молочной и гликолевой кислот и выводится из организма. Синтезированы разнообразные полимеры PLGA, содержащие свободные карбоксильные и аминогруппы, что открывает широкие возможности модификации частиц молекулами, узнающими опухолевые антигены. Получены 140-нм наночастицы PLGA, загруженные флуоресцентным красителем Nile Red и доксорубицином. Эти наночастицы стабилизировали хитозаном и конъюгировали с анти-HER2-аффибоди $Z_{\text{HER2:342}}$ с использованием EDC/сульфо-NHS. Наночастицы PLGA- $Z_{\text{HER2:342}}$ использовали для мечения HER2-сверхэкспрессирующих раковых клеток как *in vitro*, так и *in vivo*. Специфичность этих наночастиц была более чем в 60 раз выше, чем у контрольных ненаправленных наночастиц. Наночастицы PLGA- $Z_{\text{HER2:342}}$ применяли для воздействия на клетки по отдельности или в сочетании с адресным бифункциональным иммунотоксином DARP-LoPE (42 кДа). Показано, что комбинированная терапия с использованием DARP-LoPE и PLGA- $Z_{\text{HER2:342}}$ снижает эффективную концентрацию иммунотоксина в 1000 раз *in vitro*. Подобная стратегия двойного нацеливания улучшила эффективность противоопухолевой терапии HER2-позитивных клеток *in vivo* [6]. Метод синтеза и поверхностной модификации использовали в дальнейшем для создания наночастиц, загруженных фотосенсибилизатором Rose Bengal, которые при облучении светом с длиной волны 532 нм продуцируют активные формы кислорода, приводящие к гибели HER2-сверхэкспрессирующих раковых клеток [129].

Активно исследуются также наночастицы, состоящие из гибридных полимеров. Получены полимерные наночастицы из блок-сополимера полилактид-когликолида и полиэтиленгликоля, которые были модифицированы анти-HER2-аффибоди $Z_{\text{HER2:342}}$ с использованием малеимидного метода химической конъюгации и загружены паклитакселом. Такие наночастицы использовали для селективного уничтожения HER2-сверхэкспрессирующих клеток *in vitro* [130].

Разработано большое количество наночастиц, в которых полимер служит матрицей для синтеза и включения в состав как растворимых, так и нерастворимых соединений. При этом сами полимерные материалы могут иметь диагностическую и терапевтическую значимость – обладать флуоресценцией либо способностью к фототермической конверсии [131]. Так, для тераностики созданы 30-нм наночастицы на основе полимеров поли[9,9-бис(2-(2-(2-метоксиэтокси)этокси)этил)фторенилдивинилен]-альт-4,7-(2,1,3-бензотиадиазол)а, обладающего флуоресценцией в ближнекрасном диапазоне и свойствами фотосенсибилизатора, и поли[(4,4,9,9-тетраakis(4-(октилокси)фенил)-4,9-дигидро-*втор*-индаценол-дитиофен-2,7-диил)-альт-со-4,9-бис(тиофен-2-ил)-6,7-бис(4-(гексилокси)фенил)тиадиазоло-хиноксалина] с сильным поглощением в ближней инфракрасной области и отличной способностью к фототермической конверсии. Такие частицы обладали 60.4% квантовым выходом и эффективной фототермической конверсией – 47.6%. Показано, что применение двух видов воздействия – фотодинамического и фототермического – приводит к синергическому эффекту при терапии опухоли [132, 133]. Также получены 30-нм сверхразветвленные, флуоресцентные, полиэлектролитные комплексы состава ядро/оболочка. В качестве ядра использовали флуоресцентный полимер с максимумом испускания при 565 нм, полученный полициклотримеризацией алкинов, а в качестве оболочки – полиэтиленгликоль. Такие полиэлектролитные комплексы покрывали анти-HER2-аффибоди методом карбодиимидной конъюгации и использовали как эффективные флуоресцентные метки для визуализации клеток SK-BR-3 [134].

Среди полимерных наноматериалов выделяется уникальный класс контрастирующих соединений – нанопузырьки, которые используются для ультразвукового контрастирования *in vivo* [135]. Так, получены 480-нм нанопузырьки, состоящие из фосфолипидной оболочки и наполненные газом C₃F₈, покрытые анти-HER2-аффибоди через систему стрептавидин–биотин [136].

Частицы разной формы (80×320 и 55×60 нм), синтезированные с помощью технологии репликации в несмачиваемых молдах (PRINT, particle replication in nonwetting templates), были модифицированы анти-EGFR-аффибоди с различной плотностью аффибоди на поверхности наночастиц. При этом *in vivo* отмечены значительные различия в накоплении наночастиц обоих типов в опухоли в зависимости от плотности аффибоди. Максимальное отношение содержания наночастиц в опухоли и в крови наблюдали для частиц с максимальным количеством лиганда [137].

4.6. Комплексы белковых наночастиц и аффибоди

Биосовместимость и биodeградируемость белковых наночастиц делают их лидерами при переходе в клиническую практику в качестве диагностических и терапевтических препаратов. При этом успехи генетической инженерии позволяют получить полностью генетически кодируемые слитые белки с нужными функциональными характеристиками без необходимости использования методов химической конъюгации.

Одни из самых популярных белковых наночастиц – наночастицы на основе альбумина. Наночастицы альбумина были модифицированы анти-HER2-аффибоди с использованием бактериального суперклея – белковой адапторной системы SpyTag (ST)/SpyCatcher (SC), полученной из сплит-белка CnaB2 *Streptococcus pyogenes*. SpyTag – 13-аминокислотный пептид, и SpyCatcher – 15 кДа белок, формируют при связывании ковалентную пептидную связь. Систему SpyTag/SpyCatcher использовали в качестве молекулярного посредника между поверхностью наночастиц и молекулой аффибоди, гарантируя таким образом региоселективное присоединение аффибоди к наночастице практически со 100% эффективностью. Такие наночастицы были загружены фотосенсибилизатором индоцианиновым зеленым и использованы для фототермически-индуцированной гибели HER2-сверхэкспрессирующих раковых клеток [138].

Систему SpyTag/SpyCatcher также успешно использовали для модификации наночастиц на основе инкапсулина [139, 140] и люмазинсинтазы [141]. Инкапсулин (Encap) – это формирующий наночастицы относительно недавно изученный белок, выделенный из термофильных бактерий *Thermotoga maritima*. Получен слитый белок – инкапсулин–SpyTag, формирующий 35-нм наночастицы с одним из элементов адапторной системы, ST [140]. Получены также слитые белки анти-HER2–анти-EGFR-аффибоди со вторым компонентом белковой пары, а именно SC. Эти слитые белки флуоресцентно метили двумя различными красителями, легировали с наночастицами и проводили специфичную бимодальную флуоресцентную детекцию клеток с различным уровнем экспрессии HER2 и EGFR [140]. Аналогичным образом полученные наночастицы на основе люмазинсинтазы *Aquifex aeolicus* (AaLS) и загруженные комплексом гадолиния (Gd(III)-DOTA) использовали для МРТ-контрастирования опухолей с различной экспрессией HER2 и EGFR у мышей [141].

Самособирающиеся белковые наночастицы на основе, например, капсида вируса гепатита В часто используют для доставки как генов, так и белков

[142–148]. Получены 28-нм наночастицы на основе вирусного капсида, загруженные дальнекрасным флуоресцентным белком mCardinal и модифицированные анти-HER2-аффибоды. Тесты *in vivo* показали, что в опухоли частицы накапливаются активно, а в печени значительно слабее, чем наночастицы с традиционными красителями, а именно Су5.5 [142].

Получены 12-нм наночастицы из ферритина человека, состоящие из 24 субъединиц тяжелых цепей ферритина, генно-инженерно слитых с анти-EGFR-аффибоды. Такие частицы метили ближнекрасным красителем Су5.5 и использовали для визуализации EGFR-сверхэкспрессирующих клеток [149]. Для более длительной циркуляции наноструктур ферритина в кровотоке *in vivo* применяли модификации: в структуру вводили гидрофобные последовательности, формирующие гидратную оболочку сродни эффекту ПЭГилования наночастиц [150]. Применение такого подхода позволило повысить накопление наночастиц в опухоли в 2 раза, что подтверждено с помощью прижизненной визуализации *in vivo* с использованием красителя Су5.5 [150].

Установлено, что 90-нм мезопористые кремниевые наночастицы, загруженные кампотечином и покрытые белковой короной из слитого белка глутатион-S-трансфераза/анти-HER2-аффибоды, в значительно меньшей степени связываются с белками сыворотки крови, тем самым минимизируя процессы поглощения наночастиц макрофагами [151]. Такие частицы, меченные флуоресцентным красителем DiI и загруженные кампотечином – цитотоксическим хинолиновым алкалоидом, ингибирующим топоизомеразу I, применяли для визуализации и ингибирования опухолевого роста *in vivo*, эффективность которого составила 90% [151].

4.7. Модификация ДНК-тетраэдных комплексов молекулами аффибоды

Большое количество исследований посвящено разработке систем адресной доставки генетического материала. Например, молекулы анти-HER2-аффибоды $Z_{\text{HER2:2891}}$, связанные с сополимером полиэтиленгликоля и полиэтиленimina, использованы для доставки гена люциферазы в клетки BT474, сверхэкспрессирующие HER2. Показано, что интенсивность люминесценции трансфицированных HER2-сверхэкспрессирующих клеток была более чем в 300 раз выше, чем у контрольных клеток MDA-MB-231 с умеренной экспрессией HER2 [152].

ДНК может быть носителем не только генетической информации, но и химиотерапевтических препаратов. В частности, в роли каркасов выступают ДНК-тетраэдры – трехмерные структуры, получаемые из двойных спиралей ДНК длиной 20

п.н. методом ДНК-оригами. Оказалось, что ДНК-тетраэдры, химически модифицированные анти-HER2-аффибоды малеимидным методом конъюгации и нагруженные доксорубцином (53 молекулы доксорубцины на один комплекс) [153], значительно сильнее ингибировали рост клеток, чем доксорубцин, проявляя при этом гораздо меньшую токсичность в отношении клеток с нормальным уровнем HER2. Аналогичные наночастицы, загруженные цисплатином (68 молекул цисплатина на одну наночастицу), использованы для селективного уничтожения HER2-положительных клеток практически со 100% эффективностью [154].

Получен также слитый белок, состоящий из аффибоды $Z_{\text{HER2:342}}$ и пептида RALA – эффективного невирусного средства доставки нуклеиновых кислот в клетки. Аффибоды и пептид были соединены гибким глицин-сериновым линкером, устойчивым к действию протеаз $(G_4S)_3$. Полученный слитый пептид ассоциирован с FUDR₁₅ – последовательностью из 15 остатков 5-фтордезоксисуридина, метаболитом которого является химиотерапевтическое соединение – 5-фторурацил [155]. Полученная система адресно воздействует на клетки со сверхэкспрессией рецептора HER2 N87, вызывая их гибель по механизму апоптоза [155]. Впоследствии механизмы адресной доставки, разработанные в рассмотренных работах [154, 155], были объединены в систему доставки FUDR на основе ДНК-тетраэдров к клеткам опухоли, полученным инъекцией клеток BT474, использование которых привело к замедлению роста опухоли примерно в 2.5 раза [156].

4.8. Модификация квантовых точек аффибоды

Квантовые точки – флуоресцентные полупроводниковые нанокристаллы с размером ядра 1–12 нм, синтезированные из элементов II и VI групп (например, ZnS, CdSe или CdTe), реже III и V групп (InP) или IV и VI групп (PbS, PbSe, PbTe) Периодической системы Д.И. Менделеева. От традиционных флуорофоров, таких, как органические красители и флуоресцентные белки, их отличает широкая полоса поглощения, значительный стоксов сдвиг, узкий спектр излучения и высокий квантовый выход (до 80%), а также высокая фотостабильность [157, 158]. Благодаря выраженной зависимости длины волны излучения от размеров частицы, существует возможность многоцветного мечения и одновременной идентификации различных биологических объектов. Однако следует отметить, что токсичность КТ значительно ограничивает спектр их применений *in vivo* в терапевтических целях. Гораздо более многообещающим воспринимается применение КТ для картирования сторожевых лимфоузлов,

поскольку в данном случае производится местная инъекция препарата с последующим удалением лимфатического центра, пораженного метастазами.

В частности, для диагностических целей использовали квантовые точки QD655, модифицированные анти-HER2-аффибоды $Z_{\text{HER2:477}}$ через систему стрептавидин–биотин. Такие квантовые точки использовали для иммуногистохимического окрашивания срезов образцов опухолей для успешного определения HER2-статуса опухоли, а также наличия и локализации гомодимеров HER2 методами конфокальной и электронной микроскопии [159, 160].

Для визуализации *in vivo* использовали 5-нм квантовые точки QD800 (ядро/оболочка/оболочка = InAs/InP/ZnSe), которые конъюгировали с анти-HER2-аффибоды $Z_{\text{HER2:342}}$ через гетеробифункциональное производное ПЭГ с концевой аминогруппой. Аффибоды модифицировали цистеином на N-конце и осуществляли реакцию химической конъюгации с использованием N-сукцинимидилового эфира 4-малеимидомасляной кислоты. Анти-HER2 квантовые точки применяли для селективной визуализации SK-OV-3 опухолей у мышей с иммунодефицитом в режиме реального времени с использованием системы прижизненной визуализации [161]. Показано, что накопление адресных квантовых точек в опухоли примерно в 3 раза выше, чем безадресных [161].

На поверхности 8-нм квантовых точек сульфида серебра (Ag_2S) адсорбировали анти-EGFR-аффибоды $Z_{\text{EGFR:1907}}$ и применяли модифицированные частицы для фотоакустической визуализации EGFR-сверхэкспрессирующих опухолей [162]. Такие же квантовые точки, покрытые аффибоды, распознающим IGF-1R, Z_{IGF1R} , использовали *in vivo* для бимодальной фотоакустической и ближней ИК-визуализации опухолей у животных с иммунодефицитом [163].

Широкое применение нашли углеродные точки, которые обладают целым спектром уникальных оптических характеристик. Например, 20-нм углеродные точки Gd@C с инкапсулированным гадолинием обладают не только яркой флуоресценцией, но и свойством МРТ-контрастирования [164]. Такие точки были покрыты анти-EGFR-аффибоды $Z_{\text{EGFR:1907}}$ и использованы для адресной доставки *in vitro* и *in vivo*. *In vitro* показано, что МРТ-сигнал клеток HCC827 (EGFR⁺) значительно выше, чем клеток NCI-H520 (EGFR). Такие структуры эффективны также для адресной визуализации опухоли *in vivo* через 1 ч после инъекции (МРТ-сигналы опухолей HCC827 и NCI-H520 различались в 1.5 раза). Кроме того, точки Gd@C с $Z_{\text{EGFR:1907}}$ (в отличие от точек Gd@C) эффективно выводятся почками [164].

5. АДРЕСНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ НА ОСНОВЕ БЕЛКОВ ADAPT

Высокие константы аффинности белков на основе альбуминсвязывающих доменов (ABD, albumin binding domain) ADAPT позволили разработать ультрачувствительный метод обнаружения HER2 в образцах, содержащих 10% сыворотки. Так, получены квантовые точки QD625, которые модифицировали посредством самосборки белком ADAPT6, распознающим HER2. Предел обнаружения HER2 с использованием таких квантовых точек составил 40×10^{-12} М (≈ 8 нг/мл) [165].

6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Скаффолдовые (каркасные) белки можно назвать белками нового поколения [166–169]. Достаточно большое количество препаратов на основе таких белков проходит клинические испытания [170–175], а часть препаратов уже используется в тераностике (например, экаллантин на основе домена Кунитца).

Несмотря на такие преимущества, как малый размер, стабильная структура, легкость масштабной биотехнологической наработки, эти белки при их использовании в комплексе с функциональными наноструктурами имеют и недостатки, связанные, например, с региоселективным присоединением к поверхности наноструктур с сохранением распознающих свойств. Подобные проблемы решаются с использованием различных молекулярных посредников между поверхностью наночастиц и белковых молекул (таких, как SpyTag–SpyCatcher, барназа–барстар, стрептавидин–биотин), а также методов генной инженерии (например, встраивание дарпинов в оболочку вирусов).

Успехи химической модификации и генной инженерии позволяют получать наночастицы, максимально эффективные только *in vitro*. При системной инъекции в кровоток накопление адресных наночастиц в опухоли чаще всего не более чем в 2.5 раза превышает значение для ненацеленных наночастиц, а суммарное накопление в опухоли не превышает 0.7% от введенной дозы.

Наряду с разработкой адресных агентов для терапии и диагностики онкозаболеваний (а также онкотераностики), создание новых методов введения и доставки наночастиц представляется не менее приоритетным направлением нанобиомедицины, которому на сегодняшний день уделяется гораздо меньше внимания. В частности, разрабатываются методы продления циркуляции наночастиц в кровотоке, которые временно блокируют систему моноуклеаров без серьезных побочных эффектов.

Поскольку солидные опухоли представляют собой плотные гетерогенные структуры, воздействие

адресными терапевтическими соединениями на раковые клетки *in vivo* эффективно только для самых верхних слоев опухоли, в то время как глубокие клетки остаются жизнеспособными, нивелируя таким образом эффект адресного воздействия. Необходимо осуществлять блокировку процессов ангиогенеза (посредством воздействия на эндоте-

лиальные маркеры), нарушая тем самым питание глубоколежащих раковых клеток. ●

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-14-50514.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Деев С.М., Лебеденко Е.Н. // Биоорг. химия. 2015. Т. 41. № 5. С. 539–552.
- Shilova O.N., Deyev S.M. // Acta Naturae. 2019. V. 11. № 4. P. 42–53.
- Danhier F. // J. Control. Release. 2016. V. 244. № A. P. 108–121.
- Lammers T., Kiessling F., Hennink W.E., Storm G. // J. Control. Release. 2012. V. 161. № 2. P. 175–187.
- Wilhelm S., Tavares A.J., Dai Q., Ohta S., Audet J., Dvorak H.F., Chan W.C.W. // Nat. Rev. Mater. 2016. V. 1. № 5. P. 751.
- Shipunova V.O., Komedchikova E.N., Kotelnikova P.A., Zelepukin I.V., Schulga A.A., Proshkina G.M., Shramova E.I., Kutscher H.L., Telegin G.B., Kabashin A.V., et al. // ACS Nano. 2020. V. 14. № 10. P. 12781–12795.
- Nikitin M.P., Shipunova V.O., Deyev S.M., Nikitin P.I. // Nat. Nanotechnol. 2014. V. 9. № 9. P. 716–722.
- Stepanov A.V., Belogurov A.A., Ponomarenko N.A., Stremovskiy O.A., Kozlov L.V., Bichucher A.M., Dmitriev S.E., Smirnov I.V., Shamborant O.G., Balabashin D.S., et al. // PLoS One. 2011. V. 6. № 6. P. e20991.
- Zelepukin I.V., Yaremenko A.V., Shipunova V.O., Babenyshev A.V., Balalaeva I.V., Nikitin P.I., Deyev S.M., Nikitin M.P. // Nanoscale. 2019. V. 11. № 4. P. 1636–1646.
- Zelepukin I.V., Yaremenko A.V., Ivanov I.N., Yuryev M.V., Cherkasov V.R., Deyev S.M., Nikitin P.I., Nikitin M.P. // ACS Nano. 2021. doi: 10.1021/acsnano.1c00687
- Zelepukin I.V., Yaremenko A.V., Yuryev M.V., Mirkasymov A.B., Sokolov I.L., Deyev S.M., Nikitin P.I., Nikitin M.P. // J. Control. Release. 2020. V. 326. P. 181–191.
- Nikitin M.P., Zelepukin I.V., Shipunova V.O., Sokolov I.L., Deyev S.M., Nikitin P.I. // Nat. Biomed. Eng. 2020. V. 4. № 7. P. 717–731.
- Mirkasymov A.B., Zelepukin I.V., Nikitin P.I., Nikitin M.P., Deyev S.M. // J. Control. Release. 2021. V. 330. P. 111–118.
- Deyev S.M., Lebedenko E.N., Petrovskaya L.E., Dolgikh D.A., Gabibov A.G., Kirpichnikov M.P. // Rus. Chem. Rev. 2015. V. 84. № 1. P. 1–26.
- Tregubov A.A., Sokolov I.L., Babenyshev A.V., Nikitin P.I., Cherkasov V.R., Nikitin M.P. // J. Magn. Magn. Mat. 2018. V. 449. P. 590–596.
- Shipunova V.O., Nikitin M.P., Zelepukin I.V., Nikitin P.I., Deyev S.M., Petrov R.V. // Dokl. Biochem. Biophys. 2015. V. 464. P. 315–318.
- Silverman J., Liu Q., Lu Q., Bakker A., To W., Duguay A., Alba B.M., Smith R., Rivas A., Li P., et al. // Nat. Biotechnol. 2005. V. 23. № 12. P. 1556–1561.
- Nord K., Nilsson J., Nilsson B., Uhlén M., Nygren P.A. // Protein Eng. 1995. V. 8. № 6. P. 601–608.
- Tiede C., Tang A.A.S., Deacon S.E., Mandal U., Nettleship J.E., Owen R.L., George S.E., Harrison D.J., Owens R.J., Tomlinson D.C., et al. // Protein Eng. Des. Sel. 2014. V. 27. № 5. P. 145–155.
- Miller C.J., McGinnis J.E., Martinez M.J., Wang G., Zhou J., Simmons E., Amet T., Abdeen S.J., van Huysse J.W., Bowsher R.R., et al. // New Biotechnol. 2021. V. 62. P. 79–85.
- Sha F., Salzman G., Gupta A., Koide S. // Protein Sci. 2017. V. 26. № 5. P. 910–924.
- Koide A., Bailey C.W., Huang X., Koide S. // J. Mol. Biol. 1998. V. 284. № 4. P. 1141–1151.
- Zelensky A.N., Gready J.E. // FEBS J. 2005. V. 272. № 24. P. 6179–6217.
- Deuschle F.-C., Ilyukhina E., Skerra A. // Expert Opin. Biol. Ther. 2021. V. 21. № 4. P. 509–518.
- Rothe C., Skerra A. // BioDrugs. 2018. V. 32. № 3. P. 233–243.
- Orlova A., Magnusson M., Eriksson T.L.J., Nilsson M., Larsson B., Höiden-Guthenberg I., Widström C., Carlsson J., Tolmachev V., Ståhl S., et al. // Cancer Res. 2006. V. 66. № 8. P. 4339–4348.
- Ebersbach H., Fiedler E., Scheuermann T., Fiedler M., Stubbs M.T., Reimann C., Proetzel G., Rudolph R., Fiedler U. // J. Mol. Biol. 2007. V. 372. № 1. P. 172–185.
- Settele F., Zwarg M., Fiedler S., Koscheinz D., Bosse-Doenecke E. // Methods Mol. Biol. 2018. V. 1701. P. 205–238.
- Kyle S. // Trends Biochem. Sci. 2018. V. 43. № 4. P. 230–232.
- Markland W., Ley A.C., Ladner R.C. // Biochemistry. 1996. V. 35. № 24. P. 8058–8067.
- Kreihenbrink M., Chami M., Guilvout I., Alzari P.M., Pécorari F., Pugsley A.P. // J. Mol. Biol. 2008. V. 383. № 5. P. 1058–1068.
- Crook Z.R., Nairn N.W., Olson J.M. // Trends Biochem. Sci. 2020. V. 45. № 4. P. 332–346.
- Huet S., Gorre H., Perrocheau A., Picot J., Cinier M. // PLoS One. 2015. V. 10. № 11. P. e0142304.
- Steiner D., Forrer P., Plückthun A. // J. Mol. Biol. 2008. V. 382. № 5. P. 1211–1227.
- Stefan N., Martin-Killias P., Wyss-Stoockle S., Honegger A., Zangemeister-Wittke U., Plückthun A. // J. Mol. Biol. 2011. V. 413. № 4. P. 826–843.
- Stahl A., Stumpp M.T., Schlegel A., Ekawardhani S., Lehrling C., Martin G., Gulotti-Georgieva M., Villemagne D., Forrer P., Agostini H.T., et al. // Angiogenesis. 2013. V. 16. № 1. P. 101–111.
- Amstutz P., Koch H., Binz H.K., Deuber S.A., Plückthun A. // Protein Eng. Des. Sel. 2006. V. 19. № 5. P. 219–229.
- Gracy J., Chiche L. // Curr. Pharm. Des. 2011. V. 17. № 38. P. 4337–4350.
- Steemson J.D., Baake M., Rakonjac J., Arcus V.L., Liddament M.T. // PLoS One. 2014. V. 9. № 1. P. e86050.
- Hosse R.J., Rothe A., Power B.E. // Protein Sci. 2006. V. 15. № 1. P. 14–27.
- Škrlec K., Štrukelj B., Berlec A. // Trends Biotechnol. 2015. V. 33. № 7. P. 408–418.
- Lee S.-C., Park K., Han J., Lee J.-j., Kim H.J., Hong S., Heu W., Kim Y.J., Ha J.-S., Lee S.-G., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. V. 109. № 9. P. 3299–3304.

43. Grabulovski D., Kaspar M., Neri D. // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. № 5. P. 3196–3204.
44. Diem M.D., Hyun L., Yi F., Hippensteel R., Kuhar E., Lowenstein C., Swift E.J., O'Neil K.T., Jacobs S.A. // *Protein Eng. Des. Sel.* 2014. V. 27. № 10. P. 419–429.
45. Garousi J., Lindbo S., Mitran B., Buijs J., Vorobyeva A., Orlova A., Tolmachev V., Hober S. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 14780.
46. Suderman R.J., Rice D.A., Gibson S.D., Strick E.J., Chao D.M. // *Protein Expr. Purif.* 2017. V. 134. P. 114–124.
47. Coates J. // *Trends Cell Biol.* 2003. V. 13. № 9. P. 463–471.
48. Schneider S., Buchert M., Georgiev O., Catimel B., Halford M., Stackler S.A., Baechi T., Moelling K., Hovens C.M. // *Nat. Biotechnol.* 1999. V. 17. № 2. P. 170–175.
49. Kim D., Seo H.-D., Ryu Y., Kim H.-S. // *Anal. Chim. Acta.* 2020. V. 1126. P. 154–162.
50. Kim J.-W., Heu W., Jeong S., Kim H.-S. // *Anal. Chim. Acta.* 2017. V. 988. P. 81–88.
51. Lee J.-j., Kang J.A., Ryu Y., Han S.-S., Nam Y.R., Rho J.K., Choi D.S., Kang S.-W., Lee D.-E., Kim H.-S. // *Biomaterials.* 2017. V. 120. P. 22–31.
52. Khaled Y.S., Shamsuddin S., Tiernan J., McPherson M., Hughes T., Millner P., Jayne D.G. // *Eur. J. Surg. Oncol.* 2018. V. 44. P. S1.
53. Gaspar D.P., Faria V., Quintas J.P., Almeida A.J. // *Curr. Org. Chem.* 2017. V. 21. № 23. P. 2360–2375.
54. Resnier P., Lepeltier E., Emina A.L., Galopin N., Bejaud J., David S., Ballet C., Benvegna T., Pecorari F., Chourpa I., et al. // *RSC Adv.* 2019. V. 9. № 47. P. 27264–27278.
55. Vukojicic P., Béhar G., Tawara M.H., Fernandez-Villamarin M., Pecorari F., Fernandez-Megia E., Mouratou B. // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2019. V. 11. № 24. P. 21391–21398.
56. Klem R., de Ruiter M.V., Cornelissen J.J.L.M. // *Mol. Pharm.* 2018. V. 15. № 8. P. 2991–2996.
57. Grove T.Z., Cortajarena A.L., Regan L. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2008. V. 18. № 4. P. 507–515.
58. Gebauer M., Skerra A. // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2020. V. 60. P. 391–415.
59. Kobe B., Kajava A.V. // *Trends Biochem. Sci.* 2000. V. 25. № 10. P. 509–515.
60. Grönwall C., Ståhl S. // *J. Biotechnol.* 2009. V. 140. № 3–4. P. 254–269.
61. Zahnd C., Kawe M., Stumpp M.T., de Pasquale C., Tamaskovic R., Nagy-Davidescu G., Dreier B., Schibli R., Binz H.K., Waibel R., et al. // *Cancer Res.* 2010. V. 70. № 4. P. 1595–1605.
62. Binz H.K., Amstutz P., Kohl A., Stumpp M.T., Briand C., Forrer P., Grüter M.G., Plückthun A. // *Nat. Biotechnol.* 2004. V. 22. № 5. P. 575–582.
63. Schilling J., Schöppe J., Plückthun A. // *J. Mol. Biol.* 2014. V. 426. № 3. P. 691–721.
64. Li D.-L., Tan J.-E., Tian Y., Huang S., Sun P.-H., Wang M., Han Y.-J., Li H.-S., Wu H.-B., Zhang X.-M., et al. // *Biomaterials.* 2017. V. 147. P. 86–98.
65. Kotelnikova P.A., Shipunova V.O., Aghayeva U.F., Stremovskiy O.A., Nikitin M.P., Novikov I.A., Schulga A.A., Deyev S.M., Petrov R.V. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2018. V. 481. № 1. P. 198–200.
66. Shipunova V.O., Kolesnikova O.A., Kotelnikova P.A., Soloviev V.D., Popov A.A., Proshkina G.M., Nikitin M.P., Deyev S.M. // *ACS Omega.* 2021. V. 6. № 24. P. 16000–16008.
67. Shipunova V.O., Kotelnikova P.A., Aghayeva U.F., Stremovskiy O.A., Novikov I.A., Schulga A.A., Nikitin M.P., Deyev S.M. // *J. Magn. Magn. Mat.* 2019. V. 469. P. 450–455.
68. Shipunova V.O., Zelepukin I.V., Stremovskiy O.A., Nikitin M.P., Care A., Sunna A., Zvyagin A.V., Deyev S.M. // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2018. V. 10. № 20. P. 17437–17447.
69. Plückthun A. // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2015. V. 55. P. 489–511.
70. Ignatiadis M., van den Eynden G., Roberto S., Fornili M., Bareche Y., Desmedt C., Rothé F., Maetens M., Venet D., Holgado E., et al. // *J. Natl. Cancer Inst.* 2019. V. 111. № 1. P. 69–77.
71. Nahta R., Hung M.-C., Esteva F.J. // *Cancer Res.* 2004. V. 64. № 7. P. 2343–2346.
72. Shipunova V.O., Nikitin M.P., Mironova K.E., Deyev S.M., Nikitin P.I. // *IEEE 15th International Conference. Rome, Italy, 2015.* P. 13–16.
73. Deyev S.M., Waibel R., Lebedenko E.N., Schubiger A.P., Plückthun A. // *Nat. Biotechnol.* 2003. V. 21. № 12. P. 1486–1492.
74. Sreenivasan V.K.A., Ivukina E.A., Deng W., Kelf T.A., Zdobnova T.A., Lukash S.V., Veryugin B.V., Stremovskiy O.A., Zvyagin A.V., Deyev S.M. // *J. Mater. Chem.* 2011. V. 21. № 1. P. 65–68.
75. Kabashin A.V., Kravets V.G., Wu F., Imaizumi S., Shipunova V.O., Deyev S.M., Grigorenko A.N. // *Adv. Funct. Mater.* 2019. V. 29. № 26. P. 1902692.
76. Zelepukin I.V., Popov A.A., Shipunova V.O., Tikhonowski G.V., Mirkasymov A.B., Popova-Kuznetsova E.A., Klimentov S.M., Kabashin A.V., Deyev S.M. // *Mater. Sci. Eng. C.* 2021. V. 120. P. 111717.
77. Belova M.M., Shipunova V.O., Kotelnikova P.A., Babenyshev A.V., Rogozhin E.A., Cherednichenko M.Y., Deyev S.M. // *Acta Naturae.* 2019. V. 11. № 2. P. 47–53.
78. Zelepukin I.V., Shipunova V.O., Mirkasymov A.B., Nikitin P.I., Nikitin M.P., Deyev S.M. // *Acta Naturae.* 2017. V. 9. № 4 (35). P. 58–65.
79. Deyev S., Proshkina G., Ryabova A., Tavanti F., Menziani M.C., Eidelstein G., Avishai G., Kotlyar A. // *Bioconjugate Chem.* 2017. V. 28. № 10. P. 2569–2574.
80. Proshkina G., Deyev S., Ryabova A., Tavanti F., Menziani M.C., Cohen R., Katrivas L., Kotlyar A. // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2019. V. 11. № 38. P. 34645–34651.
81. Grebenik E.A., Kostyuk A.B., Deyev S.M. // *Rus. Chem. Rev.* 2016. V. 85. № 12. P. 1277–1296.
82. Khaydukov E.V., Mironova K.E., Semchishen V.A., Generalova A.N., Nechaev A.V., Khochenkov D.A., Stepanova E.V., Lebedev O.I., Zvyagin A.V., Deyev S.M., et al. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 35103.
83. Guller A.E., Generalova A.N., Petersen E.V., Nechaev A.V., Trusova I.A., Landyshev N.N., Nadort A., Grebenik E.A., Deyev S.M., Shekhter A.B., et al. // *Nano Res.* 2015. V. 8. № 5. P. 1546–1562.
84. Grebenik E.A., Nadort A., Generalova A.N., Nechaev A.V., Sreenivasan V.K.A., Khaydukov E.V., Semchishen V.A., Popov A.P., Sokolov V.I., Akhmanov A.S., et al. // *J. Biomed. Opt.* 2013. V. 18. № 7. P. 76004.
85. Generalova A.N., Kochneva I.K., Khaydukov E.V., Semchishen V.A., Guller A.E., Nechaev A.V., Shekhter A.B., Zubov V.P., Zvyagin A.V., Deyev S.M. // *Nanoscale.* 2015. V. 7. № 5. P. 1709–1717.
86. Guryev E.L., Shilyagina N.Y., Kostyuk A.B., Sencha L.M., Balalaeva I.V., Vodenev V.A., Kutova O.M., Lyubeshkin A.V., Yakubovskaya R.I., Pankratov A.A., et al. // *Toxicol. Sci.* 2019. V. 170. № 1. P. 123–132.
87. Mironova K.E., Khochenkov D.A., Generalova A.N., Rocheva V.V., Sholina N.V., Nechaev A.V., Semchishen V.A., Deyev S.M., Zvyagin A.V., Khaydukov E.V. // *Nanoscale.* 2017. V. 9. № 39. P. 14921–14928.

88. Guryev E.L., Smyshlyayeva A.S., Shilyagina N.Y., Sokolova E.A., Shanwar S., Kostyuk A.B., Lyubeshkin A.V., Schulga A.A., Konovalova E.V., Lin Q., et al. // *Molecules*. 2020. V. 25. № 18. P. 4302.
doi: 10.3390/molecules25184302.
89. Guryev E.L., Smyshlyayeva A.S., Shilyagina N.Y., Shanwar S., Kostyuk A.B., Schulga A.A., Konovalova E.V., Zvyagin A.V., Deyev S.M., Petrov R.V. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2020. V. 491. № 1. P. 73–76.
90. Shapira A., Benhar I. // *Toxins (Basel)*. 2010. V. 2. № 11. P. 2519–2583.
91. Liu W., Onda M., Lee B., Kreitman R.J., Hassan R., Xiang L., Pastan I. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012. V. 109. № 29. P. 11782–11787.
92. Guryev E.L., Volodina N.O., Shilyagina N.Y., Gudkov S.V., Balalaeva I.V., Volovetskiy A.B., Lyubeshkin A.V., Sen' A.V., Ermilov S.A., Vodenev V.A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2018. V. 115. № 39. P. 9690–9695.
93. Shipunova V.O., Shramova E.I., Schulga A.A., Shilova M.V., Deyev S.M., Proshkina G.M. // *Rus. J. Bioorg. Chem.* 2020. V. 46. № 6. P. 1156–1161.
94. Shramova E., Proshkina G., Shipunova V., Ryabova A., Kamyshinsky R., Konevega A., Schulga A., Konovalova E., Telegin G., Deyev S. // *Cancers (Basel)*. 2020. V. 12. № 10. P. 3014.
doi: 10.3390/cancers12103014.
95. Soysal S.D., Muenst S., Barbie T., Fleming T., Gao F., Spizzo G., Oertli D., Viehl C.T., Obermann E.C., Gillanders W.E. // *Br. J. Cancer*. 2013. V. 108. № 7. P. 1480–1487.
96. Deyev S., Proshkina G., Baryshnikova O., Ryabova A., Avishai G., Katrivas L., Giannini C., Levi-Kalisman Y., Kotlyar A. // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2018. V. 130. P. 296–305.
97. Limoni S.K., Moghadam M.F., Moazzeni S.M., Gomari H., Salimi F. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2019. V. 187. № 1. P. 352–364.
98. Münch R.C., Mühlebach M.D., Schaser T., Kneissl S., Jost C., Plückthun A., Cichutek K., Buchholz C.J. // *Mol. Ther.* 2011. V. 19. № 4. P. 686–693.
99. Winkler J., Martin-Killias P., Plückthun A., Zangemeister-Wittke U. // *Mol. Cancer Ther.* 2009. V. 8. № 9. P. 2674–2683.
100. Pala K., Jakimowicz P., Cyranka-Czaja A., Otlewski J. // *Mater. Res. Express*. 2015. V. 2. № 4. P. 45403.
101. Vargo K.B., Zaki A.A., Warden-Rothman R., Tsourkas A., Hammer D.A. // *Small*. 2015. V. 11. № 12. P. 1409–1413.
102. Elias A., Crayton S.H., Warden-Rothman R., Tsourkas A. // *Sci. Rep.* 2014. V. 4. P. 5840.
103. Kolb H.C., Finn M.G., Sharpless K.B. // *Angew. Chem.* 2001. V. 40. № 11. P. 2004–2021.
104. Rostovtsev V.V., Green L.G., Fokin V.V., Sharpless K.B. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002. V. 41. № 14. P. 2596–2599.
105. Tornøe C.W., Christensen C., Meldal M. // *J. Org. Chem.* 2002. V. 67. № 9. P. 3057–3064.
106. Amirshaghghi A., Altun B., Nwe K., Yan L., Stein J.M., Cheng Z., Tsourkas A. // *J. Am. Chem. Soc.* 2018. V. 140. № 42. P. 13550–13553.
107. Elias D.R., Cheng Z., Tsourkas A. // *Small*. 2010. V. 6. № 21. P. 2460–2468.
108. Elias D.R., Poloukhina A., Popik V., Tsourkas A. // *Nanomedicine*. 2013. V. 9. № 2. P. 194–201.
109. Yang M., Cheng K., Qi S., Liu H., Jiang Y., Jiang H., Li J., Chen K., Zhang H., Cheng Z. // *Biomaterials*. 2013. V. 34. № 11. P. 2796–2806.
110. Satpathy M., Zielinski R., Lyakhov I., Yang L. // *Methods Mol. Biol.* 2015. V. 1219. P. 171–185.
111. Satpathy M., Wang L., Zielinski R., Qian W., Lipowska M., Capala J., Lee G.Y., Xu H., Wang Y.A., Mao H., et al. // *Small*. 2014. V. 10. № 3. P. 544–555.
112. Satpathy M., Wang L., Zielinski R.J., Qian W., Wang Y.A., Mohs A.M., Kairdolf B.A., Ji X., Capala J., Lipowska M., et al. // *Theranostics*. 2019. V. 9. № 3. P. 778–795.
113. Liu J., Chen H., Fu Y., Li X., Chen Y., Zhang H., Wang Z. // *J. Mater. Chem. B*. 2017. V. 5. № 43. P. 8554–8562.
114. Jokerst J.V., Miao Z., Zavaleta C., Cheng Z., Gambhir S.S. // *Small*. 2011. V. 7. № 5. P. 625–633.
115. Thakor A.S., Luong R., Paulmurugan R., Lin F.I., Kempen P., Zavaleta C., Chu P., Massoud T.F., Sinclair R., Gambhir S.S. // *Sci. Transl. Med.* 2011. V. 3. № 79. P. 79ra33.
116. Ravalli A., da Rocha C.G., Yamanaka H., Marrazza G. // *Bioelectrochemistry*. 2015. V. 106. Pt B. P. 268–275.
117. Zhang C., Zhang F., Han M., Wang X., Du J., Zhang H., Li W. // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. № 1. P. 22015.
118. Pourshohod A., Jamalman M., Zeinali M., Ghanemi M., Kheirollah A. // *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 2019. V. 52. № 9524. P. 934–941.
119. Ju Y., Zhang H., Yu J., Tong S., Tian N., Wang Z., Wang X., Su X., Chu X., Lin J., et al. // *ACS Nano*. 2017. V. 11. № 9. P. 9239–9248.
120. Kwon K.C., Ryu J.H., Lee J.-H., Lee E.J., Kwon I.C., Kim K., Lee J. // *Adv. Mat.* 2014. V. 26. № 37. P. 6436–6441.
121. Lucky S.S., Idris N.M., Huang K., Kim J., Li Z., Thong P.S.P., Xu R., Soo K.C., Zhang Y. // *Theranostics*. 2016. V. 6. № 11. P. 1844–1865.
122. Badieirostami M., Carpenter C., Pratz G., Xing L., Sun C. // *MRS Adv.* 2019. V. 4. № 46–47. P. 2461–2470.
123. He L., Brasino M., Mao C., Cho S., Park W., Goodwin A.P., Cha J.N. // *Small*. 2017. V. 13. № 24. doi: 10.1002/smll.201700504.
124. Akhtari J., Rezayat S.M., Teymouri M., Alavizadeh S.H., Gheybi F., Badiee A., Jaafari M.R. // *Int. J. Pharm.* 2016. V. 505. № 1–2. P. 89–95.
125. Smith B., Lyakhov I., Loomis K., Needle D., Baxa U., Yavlovich A., Capala J., Blumenthal R., Puri A. // *J. Control. Release*. 2011. V. 153. № 2. P. 187–194.
126. Moballeggh-Nasery M., Mandegary A., Eslaminejad T., Zeinali M., Pardakhti A., Behnam B., Mohammadi M. // *J. Liposome Res.* 2021. V. 31. № 2. P. 189–194.
127. Alavizadeh S.H., Akhtari J., Badiee A., Golmohammadzadeh S., Jaafari M.R. // *Expert Opin. Drug Deliv.* 2016. V. 13. № 3. P. 325–336.
128. Beuttler J., Rothdiener M., Müller D., Frejd F.Y., Kontermann R.E. // *Bioconjugate Chem.* 2009. V. 20. № 6. P. 1201–1208.
129. Shipunova V.O., Sogomonyan A.S., Zelepukin I.V., Nikitin M.P., Deyev S.M. // *Molecules*. 2021. V. 26. № 13. P. 3955.
130. Alexis F., Basto P., Levy-Nissenbaum E., Radovic-Moreno A.F., Zhang L., Pridgen E., Wang A.Z., Marein S.L., Westerhof K., Molnar L.K., et al. // *Chem. Med. Chem.* 2008. V. 3. № 12. P. 1839–1843.
131. Narsireddy A., Vijayashree K., Adimoolam M.G., Manorama S.V., Rao N.M. // *Int. J. Nanomedicine*. 2015. V. 10. P. 6865–6878.
132. Feng G., Fang Y., Liu J., Geng J., Ding D., Liu B. // *Small*. 2017. V. 13. № 3. doi: 10.1002/smll.201602807.
133. Liu J., Feng G., Ding D., Liu B. // *Polym. Chem.* 2013. V. 4. № 16. P. 4326.
134. Pu K.-Y., Shi J., Cai L., Li K., Liu B. // *Biomacromolecules*. 2011. V. 12. № 8. P. 2966–2974.
135. Du J., Li X.-Y., Hu H., Xu L., Yang S.-P., Li F.-H. // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. № 1. P. 3887.

136. Yang H., Cai W., Xu L., Lv X., Qiao Y., Li P., Wu H., Yang Y., Zhang L., Duan Y. // *Biomaterials*. 2015. V. 37. P. 279–288.
137. Reuter K.G., Perry J.L., Kim D., Luft J.C., Liu R., DeSimone J.M. // *Nano Lett.* 2015. V. 15. № 10. P. 6371–6378.
138. Lee C., Kang S. // *Biomacromolecules*. 2021. V. 22. № 6. P. 2649–2658.
139. Choi H., Eom S., Kim H.-U., Bae Y., Jung H.S., Kang S. // *Biomacromolecules*. 2021. V. 22. № 7. P. 3028–3039.
140. Bae Y., Kim G.J., Kim H., Park S.G., Jung H.S., Kang S. // *Biomacromolecules*. 2018. V. 19. № 7. P. 2896–2904.
141. Kim H., Jin S., Choi H., Kang M., Park S.G., Jun H., Cho H., Kang S. // *J. Control. Release*. 2021. V. 335. P. 269–280.
142. Kim S.-E., Jo S.D., Kwon K.C., Won Y.-Y., Lee J. // *Adv. Sci.* 2017. V. 4. № 5. P. 1600471.
143. Nishimura Y., Mimura W., Mohamed Suffian I.F., Amino T., Ishii J., Ogino C., Kondo A. // *J. Biochem.* 2013. V. 153. № 3. P. 251–256.
144. Nishimura Y., Ishii J., Okazaki F., Ogino C., Kondo A. // *J. Drug Target*. 2012. V. 20. № 10. P. 897–905.
145. Nishimura Y., Ezawa R., Ishii J., Ogino C., Kondo A. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2017. V. 27. № 2. P. 336–341.
146. Nishimura Y., Takeda K., Ezawa R., Ishii J., Ogino C., Kondo A. // *J. Nanobiotechnology*. 2014. V. 12. P. 11.
147. Nishimura Y., Mieda H., Ishii J., Ogino C., Fujiwara T., Kondo A. // *J. Nanobiotechnology*. 2013. V. 11. P. 19.
148. Shishido T., Mieda H., Hwang S.Y., Nishimura Y., Tanaka T., Ogino C., Fukuda H., Kondo A. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010. V. 20. № 19. P. 5726–5731.
149. Kwon K.C., Ko H.K., Lee J., Lee E.J., Kim K., Lee J. // *Small*. 2016. V. 12. № 31. P. 4241–4253.
150. Lee N.K., Lee E.J., Kim S., Nam G.-H., Kih M., Hong Y., Jeong C., Yang Y., Byun Y., Kim I.-S. // *J. Control. Release*. 2017. V. 267. P. 172–180.
151. Oh J.Y., Kim H.S., Palanikumar L., Go E.M., Jana B., Park S.A., Kim H.Y., Kim K., Seo J.K., Kwak S.K., et al. // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. № 1. P. 4548.
152. Joubran S., Zigler M., Pessah N., Klein S., Shir A., Edinger N., Sagalov A., Razvag Y., Reches M., Levitzki A. // *Bioconjugate Chem.* 2014. V. 25. № 9. P. 1644–1654.
153. Zhang Y., Jiang S., Zhang D., Bai X., Hecht S.M., Chen S. // *Chem. Comm.* 2017. V. 53. № 3. P. 573–576.
154. Zhang C., Zhang H., Han M., Yang X., Pei C., Xu Z., Du J., Li W., Chen S. // *RSC Adv.* 2019. V. 9. № 4. P. 1982–1989.
155. Zhang F., Yin J., Zhang C., Han M., Wang X., Fu S., Du J., Zhang H., Li W. // *Macromol. Biosci.* 2020. V. 20. № 7. P. e2000083.
156. Zhang C., Han M., Zhang F., Yang X., Du J., Zhang H., Li W., Chen S. // *Int. J. Nanomedicine*. 2020. V. 15. P. 885–900.
157. Balalaeva I.V., Zdobnova T.A., Krutova I.V., Brilkina A.A., Lebedenko E.N., Deyev S.M. // *J. Biophotonics*. 2012. V. 5. № 11–12. P. 860–867.
158. Generalova A.N., Sizova S.V., Zdobnova T.A., Zarifullina M.M., Artemyev M.V., Baranov A.V., Oleinikov V.A., Zubov V.P., Deyev S.M. // *Nanomedicine*. 2011. V. 6. № 2. P. 195–209.
159. Peckys D.B., Hirsch D., Gaiser T., de Jonge N. // *Mol. Med.* 2019. V. 25. № 1. P. 42.
160. Peckys D.B., Korf U., de Jonge N. // *Sci. Adv.* 2015. V. 1. № 6. P. e1500165.
161. Gao J., Chen K., Miao Z., Ren G., Chen X., Gambhir S.S., Cheng Z. // *Biomaterials*. 2011. V. 32. № 8. P. 2141–2148.
162. Zhang Y., Zhao N., Qin Y., Wu F., Xu Z., Lan T., Cheng Z., Zhao P., Liu H. // *Nanoscale*. 2018. V. 10. № 35. P. 16581–16590.
163. Sun R., Zhao Y., Wang Y., Zhang Q., Zhao P. // *Nanotechnology*. 2021. V. 32. № 20. P. 205103.
164. Wu Y., Li H., Yan Y., Wang K., Cheng Y., Li Y., Zhu X., Xie J., Sun X. // *Int. J. Nanomedicine*. 2020. V. 15. P. 4691–4703.
165. Wu Y.-T., Qiu X., Lindbo S., Susumu K., Medintz I.L., Hoher S., Hildebrandt N. // *Small*. 2018. V. 14. № 35. P. e1802266.
166. Binz H.K., Plückthun A. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2005. V. 16. № 4. P. 459–469.
167. Löfblom J., Frejd F.Y., Ståhl S. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2011. V. 22. № 6. P. 843–848.
168. Martin H.L., Bedford R., Heseltine S.J., Tang A.A., Haza K.Z., Rao A., McPherson M.J., Tomlinson D.C. // *New Biotechnol.* 2018. V. 45. P. 28–35.
169. Nygren P.-A., Skerra A. // *J. Immunol. Methods*. 2004. V. 290. № 1–2. P. 3–28.
170. Renders L., Budde K., Rosenberger C., van Swelm R., Swinkels D., Dellanna F., Feuerer W., Wen M., Erley C., Bader B., et al. // *PLoS One*. 2019. V. 14. № 3. P. e0212023.
171. Mross K., Richly H., Fischer R., Scharr D., Büchert M., Stern A., Gille H., Audoly L.P., Scheulen M.E. // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 12. P. e83232.
172. Bragina O., von Witting E., Garousi J., Zelchan R., Sandström M., Orlova A., Medvedeva A., Doroshenko A., Vorobyeva A., Lindbo S., et al. // *J. Nucl. Med.* 2021. V. 62. № 4. P. 493–499.
173. Tolcher A.W., Sweeney C.J., Papadopoulos K., Patnaik A., Chiorean E.G., Mita A.C., Sankhala K., Furfine E., Gokemeijer J., Iacono L., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2011. V. 17. № 2. P. 363–371.
174. Sandström M., Lindskog K., Velikyan I., Wennborg A., Feldwisch J., Sandberg D., Tolmachev V., Orlova A., Sörensen J., Carlsson J., et al. // *J. Nucl. Med.* 2016. V. 57. № 6. P. 867–871.
175. Sörensen J., Velikyan I., Sandberg D., Wennborg A., Feldwisch J., Tolmachev V., Orlova A., Sandström M., Lubberink M., Olofsson H., et al. // *Theranostics*. 2016. V. 6. № 2. P. 262–271.

УДК 577.21

Тандемные дубликации экзонов расширяют репертуар альтернативного сплайсинга

Т. М. Иванов, Д. Д. Первущин*

Центр наук о жизни, Сколковский институт науки и технологий, Москва, 121205 Россия

*E-mail: d.pervouchine@skoltech.ru

Поступила в редакцию 06.09.2021

Принята к печати 17.01.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11583

РЕФЕРАТ Тандемные дубликации экзонов, обеспечивающие механизм адаптивной регуляции функций белков, играют важную роль в эволюции эукариотических генов. В недавних исследованиях установлена связь тандемных дубликаций с образованием взаимоисключающих экзонов, т.е. с типом альтернативного сплайсинга, при котором в зрелый транскрипт включается один и только один экзон из группы тандемно расположенных экзонов. С использованием биоинформатических методов нами заново рассмотрена проблема идентификации тандемных дубликаций экзонов в эукариотических генах и показано, что тандемно дублицированные экзоны широко распространены не только в кодирующих частях генов, но и в не-транслируемых областях. Приведен ряд примеров тандемных дубликаций экзонов, идентифицированы неаннотированные тандемно дублицированные экзоны, представлены статистические свидетельства их экспрессии с использованием больших панелей экспериментов секвенирования РНК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА альтернативный сплайсинг, структура РНК, тандемные дубликации экзонов, РНК-секвенирование.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ CDS – кодирующая последовательность ДНК; UTR – нетранслируемая область.

ВВЕДЕНИЕ

Основной движущей силой молекулярной эволюции считаются мутации, вносящие изменения в передаваемые из поколения в поколение геномные последовательности. Наиболее частый тип мутаций – однонуклеотидные полиморфизмы, которые затрагивают отдельные нуклеотиды, но не менее важным типом изменений, происходящих с ДНК, являются дубликации. Тандемные геномные дубликации представлены протяженными участками ДНК, обычно длиной более 1000 п.н., которые непосредственно примыкают друг к другу и имеют высокий уровень гомологии [1, 2].

Тандемные геномные дубликации могут затрагивать целые гены, кодирующие или не кодирующие белки, или только части отдельных генов. В последнем случае дубликация приводит к копированию только части нуклеотидной последовательности, влияя таким образом на экзон-интронную структуру [3]. Процесс, при котором дублицируется один экзон гена или эктопически объединяются два или более экзона из разных генов, получил название перемешивания экзонов (exon shuffling) [4, 5]. Во многих случаях перемешивание экзонов посредством тандемных дубликаций связано с взаимоисключающим выбором

экзонов, т.е. с регулируемым типом альтернативного сплайсинга, при котором только один экзон из группы экзонов включается в зрелый транскрипт [6, 7].

Взаимоисключающие экзоны (mutually exclusive exons, MXE) обнаружены во многих генах, например, в генах кадгерина-N (*CadN*) [8, 9], тяжелой цепи миозина (*MHC*) [10], *14-3-3ξ* [11], *srp* [12] и гене множественной лекарственной устойчивости (*MRP*) [13] *Drosophila melanogaster*, в гене фактора транскрипции FOX млекопитающих [14], а также в генах семейства тропомиозина [15]. Возможно, наиболее яркий пример взаимоисключающего сплайсинга, возникшего в результате тандемных дубликаций, представляет ген *DSCAM1 D. melanogaster*, содержащий четыре группы кластеров MXE, которые вместе могут привести к образованию до 38016 различных изоформ белка DSCAM1 [16–21].

Проведенное в 2002 году систематическое исследование дубликаций экзонов и их роли в альтернативном сплайсинге показало, что около 10% генов животных содержат тандемно дублицированные экзоны, и обнаружило более 2000 неаннотированных MXE-кандидатов путем идентификации гомологии с соседними экзонами или с близлежащими участками ДНК [22]. Однако тандемные дубликации

экзонов могут охватывать также интронные и не-транслируемые области (untranslated regions, UTR), которые не примыкают непосредственно к аннотированным экзонам, а базы данных аннотаций генома значительно расширились с тех пор. В данной работе мы вернулись к поиску гомологичных экзонов в полных последовательностях генов, а также в их геномных окрестностях и обнаружили, что тандемные дубликации экзонов простираются далеко за пределы белоккодирующей части гена и довольно часто встречаются в нетранслируемых областях. Нами получена динамическая картина представленности экзонных дубликаций в зависимости от гомологии нуклеотидных последовательностей и приведен ряд характерных примеров таких дубликаций.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Геномы и аннотации

Геномная последовательность человека (сборка hg19, GRCh37.p13) получена из Genome Reference Consortium [23]. Исчерпывающая аннотация транскриптов генов человека (GENCODE comprehensive gene annotation) версии 19 получена из базы данных GENCODE [24]. Геномы *D. melanogaster* (BDGP Release 6, dm6) и *Caenorhabditis elegans* (WBcel235, ce11) получены из базы данных UCSC Genome Browser [25]. Аннотации транскриптов *D. melanogaster* получены из базы данных FlyBase релиз dmel_r6.32 [26]. Аннотации транскриптов *C. elegans* релиз 104 получены из базы данных Wormbase [27]. Аннотации транскриптов RefSeq получены из базы данных NCBI RefSeq database [28]. Рассматривали только экзоны и транскрипты белоккодирующих генов. Число экзонов, уникальных для человека, *D. melanogaster* и *C. elegans*, составило 329983, 83276 и 172984 соответственно.

Поиск гомологии экзонов

Для идентификации тандемных дубликаций экзонов использовали программу exonerate EMBL-EBI [29]. Нуклеотидную последовательность каждого экзона выравнивали с последовательностью его гена, которая удлинялась в обоих направлениях на 15% длины гена. Поскольку гены человека в среднем намного длиннее генов дрозофилы, для поиска мы использовали процент длины гена, а не окно фиксированной длины. Порог отсека 15% выбран потому, что расстояние от гена до ближайшего соседа не превосходит 15% длины гена для половины генов дрозофилы. Программу запускали в исчерпывающем (exhaustive) режиме для получения точного выравнивания. Минимальный процент отсека идентичности установлен равным 50%,

однако exonerate не обнаружил гомологию последовательностей ниже 57%. Последовательности выравниваний были извлечены с помощью программы getfasta из пакета bedtools [30]. Выравнивания последовательностей были организованы в таблицу bed12, в которой каждая строка соответствует одному выравниванию, в дальнейшем называемому парой запрос-мишень, включая выравнивания экзона на себя. После удаления выравниваний экзона на самого себя таблица содержала 116320, 5244 и 5605 пар запрос-мишень генов человека, *D. melanogaster* и *C. elegans* соответственно.

Процедура фильтрации для пар запрос-мишень

Для идентификации неаннотированных тандемных дубликаций экзонов мы отфильтровали таблицу пар запрос-мишень с помощью программы bedtools intersect следующим образом. Мы удалили пары запрос-мишень, в которых последовательность мишени пересекает по крайней мере один аннотированный экзон более чем по 5% ее длины. Кроме того, мы удалили пары запрос-мишень, в которых последовательность мишени пересекает по крайней мере один аннотированный геномный повтор или последовательность низкой сложности более чем по 10% ее длины в соответствии с треками аннотированных повторов из браузера генома UCSC [25].

Данные РНК-секвенирования

Мы использовали данные РНК-секвенирования 6625 образцов консорциума Genotype-Tissue Expression Project (GTEx) версии v7 [31]. Короткие прочтения (риды) были выровнены на геном человека с помощью картировщика STAR v2.4.2a [32]. Прочтения с разрывами (split reads, сплит-чтения), поддерживающие экзон-экзонные соединения, были извлечены с помощью пакета программ IPSA с настройками по умолчанию [33] (порог энтропии Шеннона 1.5 бит). Учитывали только сплит-чтения с каноническими динуклеотидами GT/AG. Уникально картированные прочтения выбраны на основе наличия метки (тега) NH:1 из файлов в формате BAM. Среднее покрытие ридями и показатели консервативности PhastCons рассчитывали с использованием программного пакета Deeptools [34].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Коэффициент дубликации

Для обнаружения экзонных дубликаций мы использовали самые большие на сегодняшний день наборы данных по аннотации экзонов, включая базы GENCODE [35] и RefSeq [28]. Проведен поиск гомологии последовательностей для каждого экзона

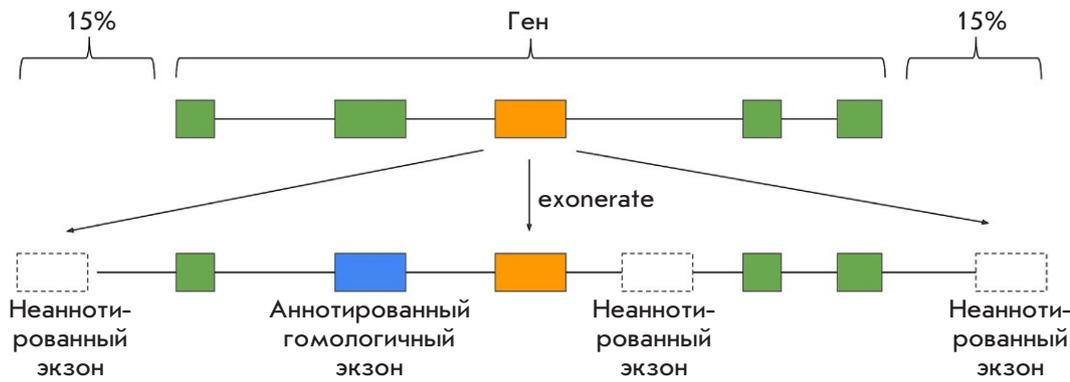


Рис. 1. Схема поиска тандемных дубликаций экзонов. Нуклеотидная последовательность каждого экзона выравнивается на нуклеотидную последовательность гена, расширенную в обе стороны на 15% длины

в расширенной нуклеотидной последовательности его гена с помощью программы exonerate [29]. В дальнейшем мы будем называть аннотированные экзоны запросными последовательностями, или просто запросами, а их гомологи, обнаруженные с помощью exonerate, – мишенями (рис. 1). Каждая пара запрос-мишень характеризуется ковариатами, относящимися к запросу (например, местоположение в пределах CDS или UTR), ковариатами, относящимися к мишени (например, доля длины мишени, перекрывающаяся с аннотированными экзонами), и процентом гомологии между запросом и мишенью. Поскольку многие экзоны подвергаются альтернативному сплайсингу и вносят таким образом вклад в качестве перекрывающихся областей в наборы аннотаций экзонов, мы ввели показатель коэффициента дубликации (nucleotide increase ratio, NIR), который определяется как отношение суммарного числа нуклеотидов, покрытых мишенями, к суммарному числу нуклеотидов, покрытых запросами с заданным или более высоким процентом гомологии нуклеотидных последовательностей. По построению NIR всегда больше 1, поскольку каждый запрос служит своей собственной мишенью со 100% идентичностью последовательности. NIR можно вычислить для всех экзонов, а также только для экзонов в кодирующих или только в нетранслируемых областях. Таблицы, перечисляющие пары запрос-мишень, доступны в онлайн репозитории <https://zenodo.org/record/5474863>.

Как и ожидалось, значения NIR уменьшаются с увеличением порога на гомологию последовательностей (рис. 2А). Несмотря на использование 50% порога на гомологию последовательностей, exonerate не обнаружил гомологичных пар запрос-мишень со степенью гомологии ниже 57%. Выбрав порог отсечения по гомологии 80%, что соответствует середине интервала 60–100%, в котором расположены степени гомологии всех мишеней, мы обнаружили, что около 2% экзонных нуклеотидов человека в белоккодирующих областях подвергаются дубликациям при пороге отсечения по гомологии последовательностей в 80% или более, в то время как только

0.08% экзонных нуклеотидов *D. melanogaster* и 0.06% экзонных нуклеотидов *C. elegans* подвергаются дубликациям. Очевидно, это связано с тем, что неаннотированные мишени экзонных нуклеотидов принадлежат интронным областям, а интроны человека намного длиннее, чем интроны *D. melanogaster* и *C. elegans*. Примечательно, что при рассмотрении только экзонов, которые расположены в UTR, почти 15% экзонных нуклеотидов человека подвергаются дубликациям при пороге отсечения по гомологии последовательностей в 80% или более (рис. 2А), а соответствующие пропорции для *D. melanogaster* и *C. elegans* составляют 0.3 и 0.2%, что указывает на значительно более высокую частоту дубликаций экзонов в UTR.

Затем мы выяснили, не являются ли одни гены более склонными к тандемным дубликациям экзонов, чем другие. Чтобы ответить на этот вопрос, мы вычислили значения NIR для каждого аннотированного гена отдельно и построили частотные распределения NIR (рис. 2Б). Частоты значений NIR подчиняются степенному закону распределения, о чем свидетельствует близкая к линейной зависимость логарифма частоты от логарифма значения NIR со значительным отклонением в сторону более высоких частот для больших значений NIR в некоторых генах. Гены человека с отклоняющимися значениями NIR для экзонов CDS включают в себя *SAMK1D* (кальций/кальмодулин-зависимая протеинкиназа), *CLYBL* (цитрамалил-КоА-лиаза) и *NBPF20* (neuroblastoma breakpoint family), однако некоторые гены человека также имеют отклоняющиеся значения NIR и для нетранслируемых областей, например *OBSCN* (обскурин) и *NEB* (небулин). Генами с заметными отклонениями по числу тандемных дубликаций у *D. melanogaster* были *dpy*, *hydra* и *heph*.

Различия в склонности к тандемным дубликациям между генами с высоким значением NIR по сравнению с остальными генами могут быть обусловлены различиями в длинах экзонов. Чтобы выяснить так ли это, мы сравнили значения NIR в группах экзонов разной длины, используя 10 интервалов одина-

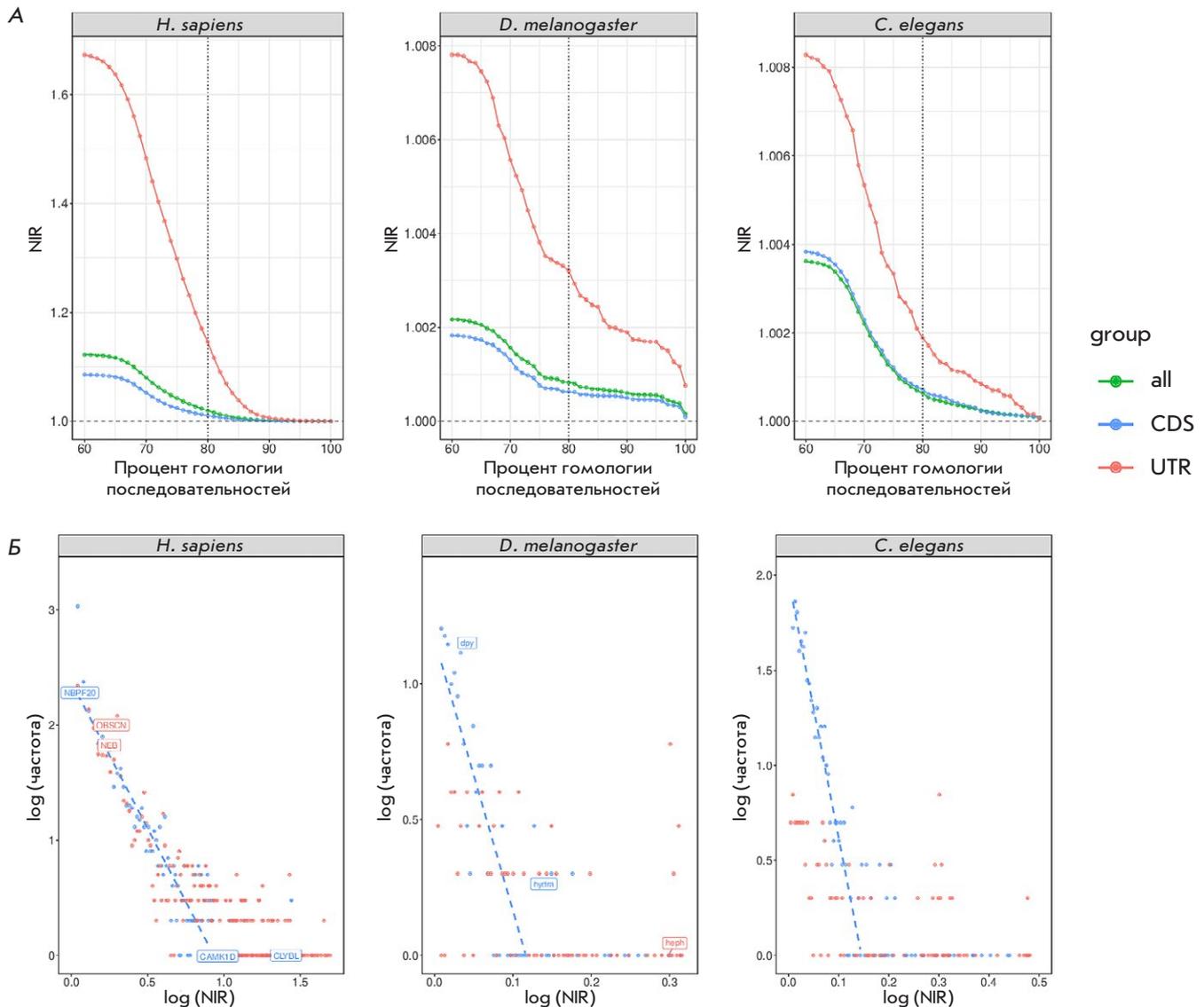


Рис. 2. Коэффициенты дупликации (NIR) в геномах человека, *D. melanogaster* и *C. elegans* как функция процента гомологии нуклеотидных последовательностей запрос-мишень (A) и распределение частот значений NIR в генах человека, *D. melanogaster* и *C. elegans* при пороге гомологии нуклеотидных последовательностей запрос-мишень 80% (Б). Приведены имена генов, существенно отклоняющихся от степенной зависимости

ковой ширины. Оказалось, что значения NIR уменьшаются примерно в 4 раза при увеличении длины экзона с 20 до 220 нуклеотидов, что указывает на то, что более длинные экзоны не вносят большой вклад в значение NIR. Действительно, чем длиннее экзон, тем меньше вероятность найти его гомолог при условии сохранения порога отсечения 80% на гомологию последовательностей. Кроме того, средняя длина экзона у 200 генов с наивысшими значениями NIR статистически значимо не отличается от средней длины экзона в генеральной совокупности всех экзонов (критерий Вилкоксона, P -значение = 0.2). Таким образом, длины экзонов существенно не влияют на склонность к тандемным дупликациям. Анализ 200 генов

с наиболее высоким значением NIR обнаружил преобладание онтологических категорий, относящихся к клеточной адгезии и развитию нервной системы (биологическая функция), связыванию ионов и активности рецепторов (молекулярная функция), и мембранной локализации (клеточные компартменты).

Для дальнейшего исследования структуры экзонных дупликаций в этих генах создан трек-хаб для геномного браузера UCSC в качестве инструмента визуализации всех пар запрос-мишень. В качестве положительного контроля мы подтвердили, что наша процедура успешно идентифицировала кластеры тандемно дублированных экзонов в генах, в которых такие кластеры были известны ранее

[10–13] (данные не приведены). Чтобы обнаружить новые неаннотированные тандемные дубликации экзонов, мы исключили из рассмотрения пары запрос-мишень, которые перекрывают любой аннотированный экзон, а также отфильтровали мишени, которые пересекают аннотированные повторы или участки ДНК низкой сложности, поскольку последние могут содержать экзоны, возникшие по другому механизму, например, через экзонизацию транспозонов [36]. Мы также исследовали статистические свидетельства экспрессии вновь обнаруженных экзонов, используя данные секвенирования РНК из проекта Genotype Tissue Expression Project [31], а именно, их покрытие короткими прочтениями и поддержку экзон-экзонных соединений.

ПРИМЕРЫ

Обскурин (OBSCN)

Один из генов человека, подверженных тандемным дубликациям экзонов, – обскурин (OBSCN). Этот ген состоит из более 150000 п.н. и содержит более 80 экзонов [37]. Белок, кодируемый геном OBSCN, принадлежит к семейству гигантских сакромерных сигнальных белков, в которое входят также титин и небулин [38]. OBSCN высоко экспрессируется в сердце (RPKM 8.6), простате (RPKM 2.9) и других тканях [31].

Наш анализ показывает, что подавляющее большинство экзонов обскурина гомологичны друг другу и имеют одинаковую длину, что указывает на их образование в результате тандемной дубликации (рис. 3). Наличие повторов в промежуточных интронах свидетельствует об их возникновении в ходе нескольких раундов геномных дубликаций, вероятно, в результате негомологичной рекомбинации. Примечательно, что один из промежуточных интронов содержит область, гомологичную другим экзонам, но не аннотированную как экзон (рис. 3, показана голубым цветом). Функциональность этой области подтверждается высокой степенью консервативности (PhastCons) и наличием сплит-ридов, поддерживающих экзон-экзонные соединения. Интересно, что тот же самый промежуточный интрон содержит и другую область с высоким уровнем консервативности (PhastCons), которая также включает сплит-риды, поддерживающие экзон-экзонные соединения. Однако эта область обладает меньшей степенью гомологии с другими экзонами (процент идентичности последовательностей 62.4% против 78.9% у других областей).

UDP-глюкуронозилтрансфераза (UGT1A)

Ген UGT1A человека кодирует UDP-глюкуронозилтрансферазу и содержит 13 уникальных альтерна-

тивных начальных экзонов, за которыми следуют четыре конститутивных экзона. Этот ген ассоциирован с такими заболеваниями, как синдром Гилберта [39] и синдром Криглера–Найяра [40]. Каждый начальный экзон регулируется собственным промотором и кодирует сайт связывания субстрата, в результате чего образуются белки с разными N-концами и идентичными C-концами. Наш анализ показывает, что переменные начальные экзоны этих генов гомологичны друг другу (рис. 4), что дает основания предположить возможность их происхождения в результате серии тандемных дубликаций. В 5'-UTR этого гена содержится консервативная область, которая гомологична начальным экзонам, но не аннотирована как экзон (рис. 4). Следует отметить, что все начальные экзоны этого гена включаются в зрелый транскрипт взаимно-исключающим образом.

Примеры тандемных дубликаций в нетранслируемых областях генов *D. melanogaster*

В качестве двух интересных примеров тандемных дубликаций экзонов в нетранслируемых областях генов *D. melanogaster* можно привести гены *hydra* (рис. 5A) и *pip* (рис. 5B). Ген *hydra* содержит девять гомологичных начальных экзонов, которые сплайсируются взаимноисключающим образом, тогда как ген *pip* имеет восемь тандемно повторяющихся гомологичных кластеров взаимноисключающих терминальных экзонов. Показано, что начальный экзон гена *hydra* подвергся рекуррентным дубликациям, и семь из этих альтернативных начальных экзонов фланкированы на своей 3'-стороне транспозоном DINE-1 [41]. По крайней мере четыре из девяти дублицированных начальных экзонов могут функционировать как альтернативные сайты начала транскрипции [41]. Однако 3'-нетранслируемая область гена *pip*, который кодирует сульфотрансферазу и вносит вклад в формирование и полярность дорсально-вентральной оси эмбриона, изучена гораздо менее полно. Недавно показали, что взаимноисключающее использование экзонов в 3'-UTR этого гена зависит от конкурирующих вторичных структур РНК [42].

Свидетельства экспрессии тандемно дублицированных экзонов по данным секвенирования РНК

Экспрессию тандемных дубликаций экзонов оценивали с использованием данных секвенирования РНК, рассматривали пары запрос-мишень в генах человека, в которых мишень не пересекается ни с аннотированными экзонами, ни с повторами, оставшиеся мишени объединяли с помощью программы bedtools merge.

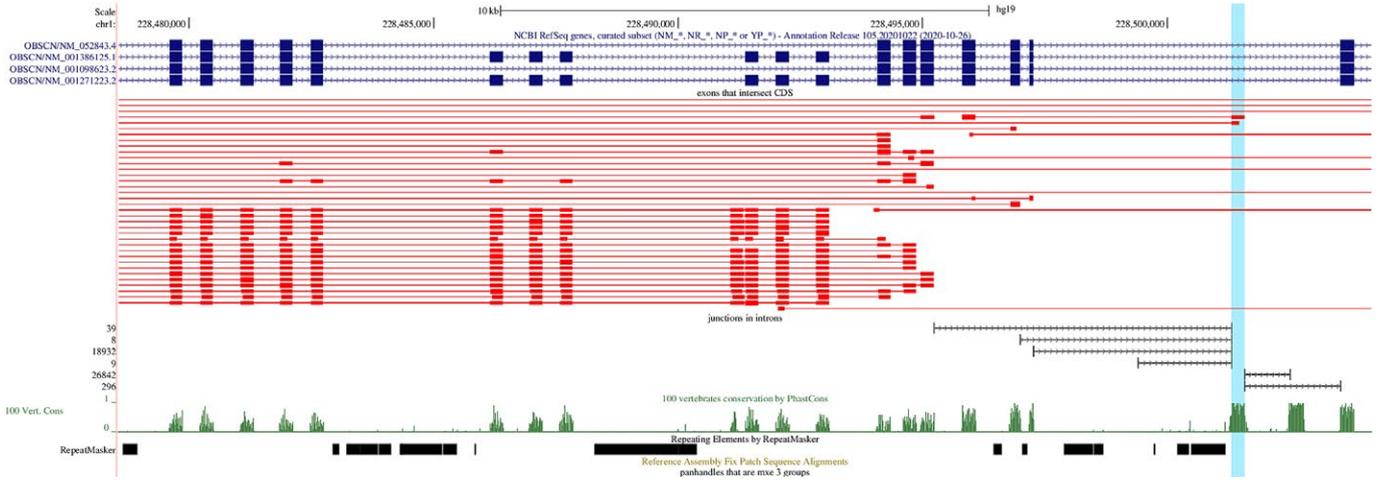


Рис. 3. Диаграмма тандемных экзонных дупликаций в гене обскурина (*OBSCN*). Темно-синим цветом показаны аннотированные транскрипты (GENCODE и RefSeq). Красным показаны пары запрос-мишень; запросы показаны толстыми прямоугольниками, а мишени – тонкими. Следующий трек показывает поддержку экзонных границ сплит-ридами. Значения степени консервативности (PhastCons) показаны зеленым цветом

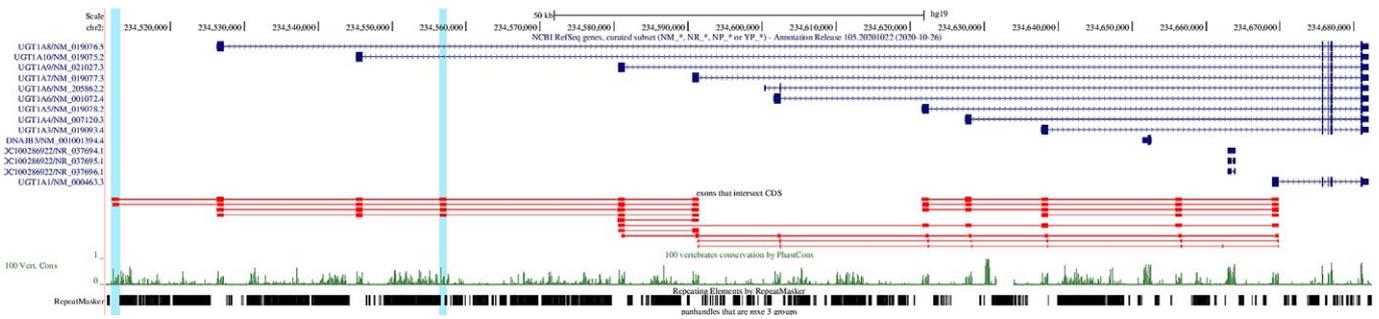


Рис. 4. Диаграмма тандемных экзонных дупликаций в гене UDP-глюкуронозилтрансферазы *UGT1A*; обозначения, как на рис. 3

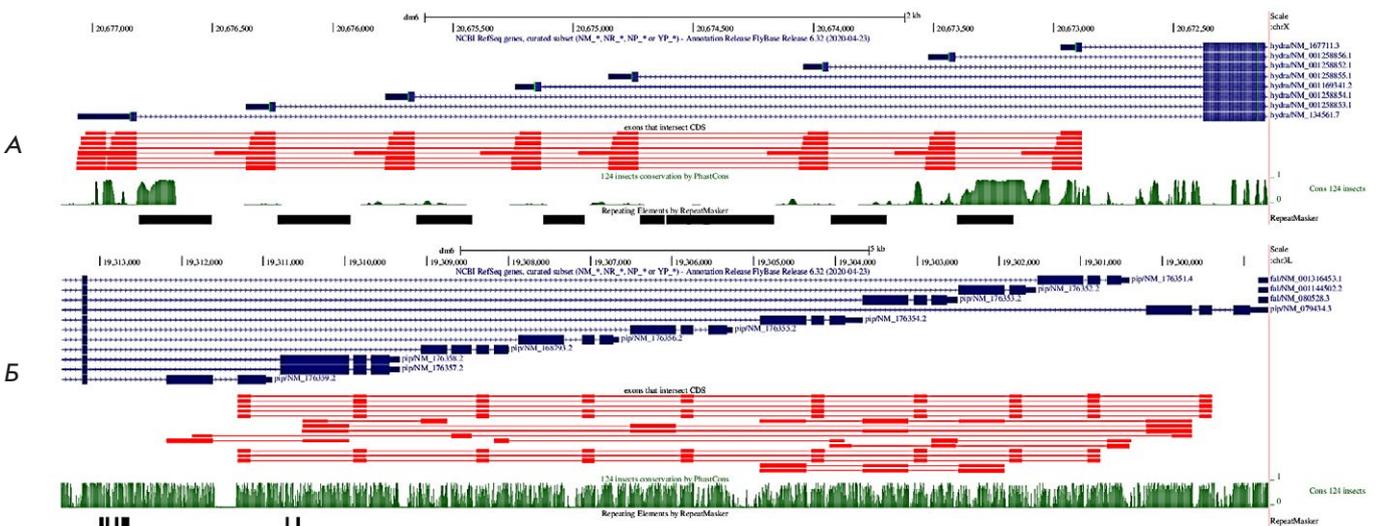


Рис. 5. Диаграмма тандемных экзонных дупликаций в генах *hydra* (A) и *pip* (B); обозначения, как на рис. 3

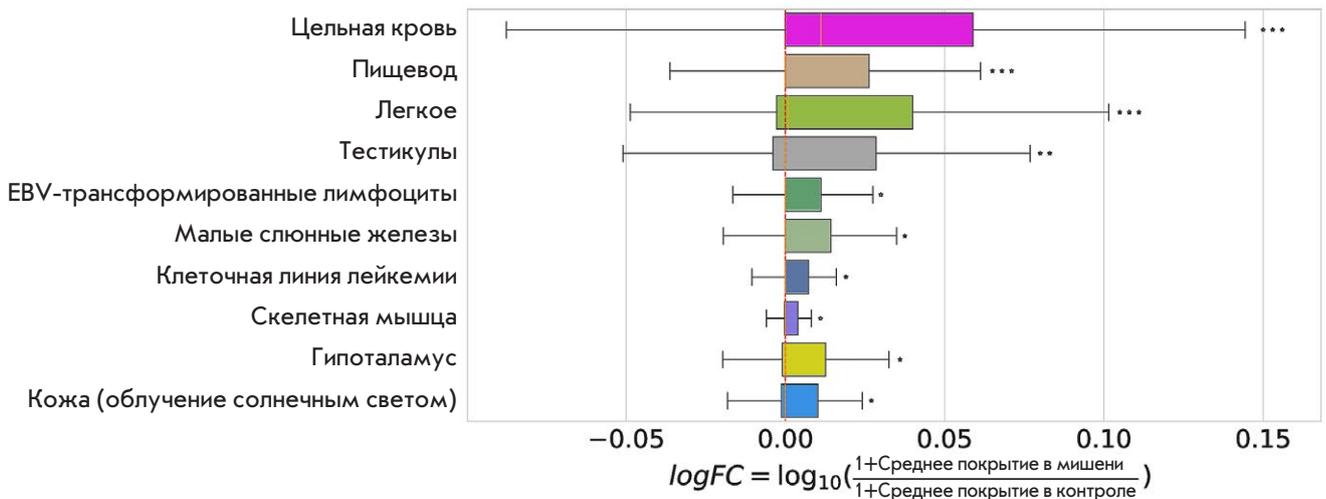


Рис. 6. Распределение значений метрики $\lg FC_i$ в тканях GTEx для мишеней с по крайней мере 80% гомологией нуклеотидной последовательности. Цвета тканей соответствуют стандартной цветовой палитре консорциума GTEx [31]. Показаны только те ткани, которые имеют значимое отклонение метрики $\lg FC_i$ от нуля (в порядке уменьшения статистической значимости). Уровни значимости вычислены с помощью знакового рангового критерия Вилкоксона после поправки Бенджамини–Хохберга на множественное тестирование

Эта процедура дала 4027 интронных мишеней, каждую из которых случайным образом сопоставляли с контрольной областью такой же длины, расположенной на 30 н. в сторону 5'- или 3'-конца гена.

Одна из основных проблем оценки экспрессии тандемных дупликаций экзонов с использованием данных секвенирования РНК заключается в том, что в случае высокой идентичности нуклеотидной последовательности запроса и мишени короткие чтения одинаково хорошо выравниваются как с последовательностью запроса, так и с последовательностью мишени. Поэтому мы исключили из анализа все короткие чтения, которые картировались более чем на одну позицию в геноме, и вычислили среднее покрытие ридов каждой мишени и соответствующей контрольной области в каждом из 53 транскриптомов тканей из проекта Genotype-Tissue Expression (GTEx) [31], используя только однозначные картирования. Затем мы вычислили показатель $\lg FC_i = \lg(1 + \text{target}_i) - \lg(1 + \text{control}_i)$, где target_i – среднее покрытие мишени в ткани i , а control_i – среднее покрытие контрольного региона в ткани i . Ткани с недостаточным количеством значений $\lg FC_i$ (мочевой пузырь, эндоцервикс и экзоцервикс шейки матки) были исключены из дальнейшего анализа. В группе мишеней, которые обладали по меньшей мере 80% гомологией нуклеотидной последовательности с запросом, мы наблюдали значительное положительное отклонение метрики $\lg FC_i$ от нуля (знаковый ранговый критерий Вилкоксона), которое в некоторых тканях оставалось значимым после коррекции Бенджамини–Хохберга на множественное тестирова-

ние, например в крови, пищеводе, легких, тестикулах, мышцах, мозге, а также в некоторых трансформированных клетках (рис. 6). Следует отметить, что тест Вилкоксона обнаружил статистически значимые отклонения от нуля даже в тех случаях, когда медиана выборки близка к нулю, что указывает на преобладание больших положительных значений в выборке разностей. Мы также наблюдали увеличение количества сплит-ридов, поддерживающих экзон-экзонные соединения в тандемно дублированных экзонах с более высокой идентичностью нуклеотидных последовательностей (рис. 7). Эти результаты показывают, что по крайней мере некоторые из неаннотированных тандемно дублированных экзонов действительно могут экспрессироваться, причем тканеспецифичным образом.

В заключение мы вычислили разницу между средними показателями степени консервативности PhastCons [43], полученной из множественного выравнивания геномов 100 видов позвоночных между мишенями и соответствующими им контрольными регионами. Мишени оказались в среднем более эволюционно консервативными, чем контрольные области (знаковый ранговый критерий Вилкоксона, $P = 0.009$), что также указывает на их возможную функциональность.

ОБСУЖДЕНИЕ

Интересное наблюдение, сделанное в этой работе, заключается в том, что тандемные дупликации экзонов преобладают не только в кодирующих, но также и в нетранслируемых областях эукарио-

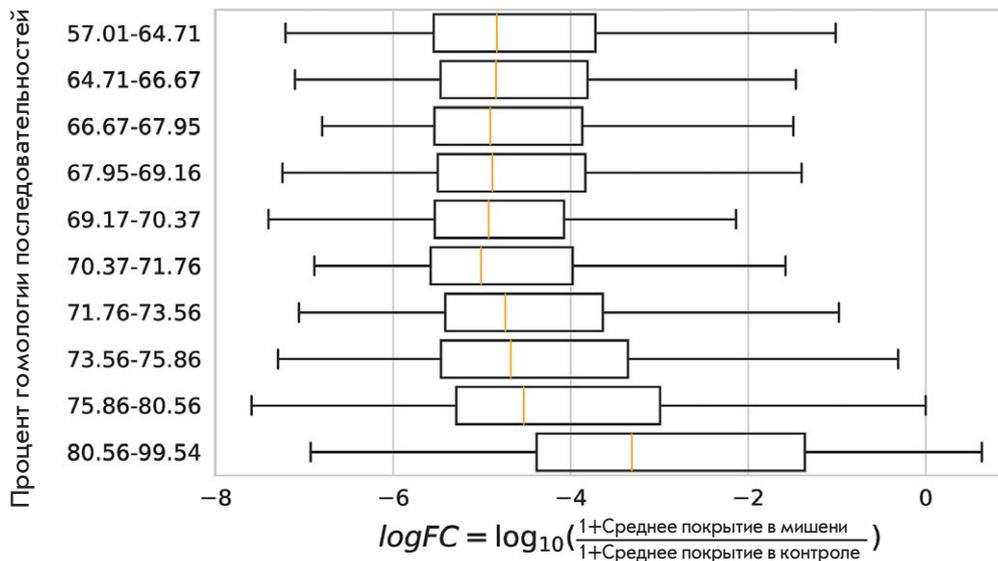


Рис. 7. Распределение значений метрики $\lg FC_i$ для сплит-ридов. Метрика $\lg FC_i$ вычислена как $\lg FC_i = \lg(1 + target_i) - \lg(1 + control_i)$, где $target_i$ ($control_i$ соответственно) равно суммарному числу уникально картированных сплит-ридов, поддерживающих экзонные границы мишени (контроля соответственно) в ткани i

тических генов. Более того, они, по-видимому, связаны с взаимоисключающим выбором tandemно дублированных начальных и конечных экзонов. Недавнее исследование показало, что регуляторный механизм, лежащий в основе взаимоисключающего выбора 3'-вариабельных областей в пре-мРНК гена *PGRP-LC* у *D. melanogaster*, задействует конкурирующие структуры РНК [42]. Эти структуры РНК совместно регулируют отбор 3'-UTR посредством активации проксимального 3'-сайта сплайсинга и одновременного подавления интрон-проксимального 5'-сайта сплайсинга вместе со стерической конкуренцией за спаривание РНК [42]. Сходная регуляторная программа действует и в 3'-вариабельных областях генов *D. melanogaster* *CG42235* и *rip*. Это наблюдение заставляет задуматься о том, не могут ли tandemные дубликации экзонов в нетранслируемых областях контролироваться конкурирующими структурами РНК некоторым общим образом.

В недавней работе мы предложили эволюционный механизм образования конкурирующих структур РНК, связанных с взаимоисключающим сплайсингом через геномные дубликации, которые затрагивают не только экзоны, но и соседние с ними интроны со шпилечными структурами РНК [44]. Согласно этой гипотезе, дубликация одной из двух цепей интронной шпилечной структуры автоматически приводит к образованию двух последовательностей, которые конкурируют за спаривание оснований с третьей последовательностью. Это соответствует часто наблюдаемому механизму регуляции сплайсинга МХЕ через конкурирующие структуры РНК [13–15, 21]. В частности, из этой модели вытекает, что взаимоисключающий сплайсинг, опосредованный конкурирующими структурами РНК, является неизбежным следствием tandemных дубликаций. Принимая

во внимание большое количество консервативных комплементарных областей в нетранслируемых областях генов человека [45], вероятным представляется то, что tandemные дубликации экзонов внутри UTR также могут автоматически генерировать конкурирующие структуры РНК, приводящие к взаимоисключающему включению экзонов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Tandemные дубликации экзонов широко представлены не только в кодирующих частях, но и в нетранслируемых областях эукариотических генов. Вовлечены ли конкурирующие РНК-структуры в регуляцию взаимоисключающего сплайсинга этих экзонов и могут ли они образовываться как побочный продукт tandemных геномных дубликаций? Ответ на этот вопрос остается открытым. ●

Авторы выражают благодарность М.А. Калининой, Д.А. Скворцову и О.А. Донцовой за содержательные обсуждения.

Работа поддержана грантами РФФИ № 19-34-90174 и 18-29-13020-МК. Работа по анализу данных РНК-секвенирования поддержана грантом 21-64-00006 Российского научного фонда.

Авторы заявляют, что у них нет конкурирующих интересов.

Д.П. разработал план и руководил исследованием; Т.И. провел анализ данных.

Оба автора участвовали в написании текста статьи, прочитали и одобрили его.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Emanuel B.S., Shaikh T.H. // *Nat. Rev. Genet.* 2001. V. 2. № 10. P. 791–800.
2. Mehan M.R., Freimer N.B., Ophoff R.A. // *Hum. Genomics.* 2004. V. 1. № 5. P. 335–344.
3. Ma M.Y., Lan X.R., Niu D.K. // *Peer J.* 2016. V. 4. P. e2272.
4. Kolkman J.A., Stemmer W.P. // *Nat. Biotechnol.* 2001. V. 19. № 5. P. 423–428.
5. Patthy L. // *Gene.* 1999. V. 238. № 1. P. 103–114.
6. Suyama M. // *Bioinformatics.* 2013. V. 29. № 17. P. 2084–2087.
7. Kondrashov F.A., Koonin E.V. // *Hum. Mol. Genet.* 2001. V. 10. № 23. P. 2661–2669.
8. Nern A., Nguyen L.V., Herman T., Prakash S., Clandinin T.R., Zipursky S.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. № 36. P. 12944–12949.
9. Ting C.Y., Yonekura S., Chung P., Hsu S.N., Robertson H.M., Chiba A., Lee C.H. // *Development.* 2005. V. 132. № 5. P. 953–963.
10. George E.L., Ober M.B., Emerson C.P. // *Mol. Cell. Biol.* 1989. V. 9. № 7. P. 2957–2974.
11. Messaritou G., Leptourgidou F., Franco M., Skoulakis E.M. // *FEBS Lett.* 2009. V. 583. № 17. P. 2934–2938.
12. Waltzer L., Bataillé L., Peyrefitte S., Haenlin M. // *EMBO J.* 2002. V. 21. № 20. P. 5477–5486.
13. Grailles M., Brey P.T., Roth C.W. // *Gene.* 2003. V. 307. P. 41–50.
14. Gabut M., Samavarchi-Tehrani P., Wang X., Slobodeniuc V., O’Hanlon D., Sung H.K., Alvarez M., Talukder S., Pan Q., Mazzoni E.O., et al. // *Cell.* 2011. V. 147. № 1. P. 132–146.
15. Gooding C., Smith C.W. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2008. V. 644. P. 27–42.
16. Chen B.E., Kondo M., Garnier A., Watson F.L., Püettmann-Holgado R., Lamar D.R., Schmucker D. // *Cell.* 2006. V. 125. № 3. P. 607–620.
17. He H., Kise Y., Izadifar A., Urwyler O., Ayaz D., Parthasarathy A., Yan B., Erfurth M.L., Dascenco D., Schmucker D. // *Science.* 2014. V. 344. № 6188. P. 1182–1186.
18. Hughes M.E., Bortnick R., Tsubouchi A., Bäumer P., Kondo M., Uemura T., Schmucker D. // *Neuron.* 2007. V. 54. № 3. P. 417–427.
19. Hummel T., Vasconcelos M.L., Clemens J.C., Fishilevich Y., Vossball L.B., Zipursky S.L. // *Neuron.* 2003. V. 37. № 2. P. 221–231.
20. Matthews B.J., Kim M.E., Flanagan J.J., Hattori D., Clemens J.C., Zipursky S.L., Grueber W.B. // *Cell.* 2007. V. 129. № 3. P. 593–604.
21. Soba P., Zhu S., Emoto K., Younger S., Yang S.J., Yu H.H., Lee T., Jan L.Y., Jan Y.N. // *Neuron.* 2007. V. 54. № 3. P. 403–416.
22. Letunic I., Copley R.R., Bork P. // *Hum. Mol. Genet.* 2002. V. 11. № 13. P. 1561–1567.
23. Church D.M., Schneider V.A., Graves T., Auger K., Cunningham F., Bouk N., Chen H.C., Agarwala R., McLaren W.M., Ritchie G.R., et al. // *PLoS Biol.* 2011. V. 9. № 7. P. e1001091.
24. Harrow J., Frankish A., Gonzalez J.M., Tapanari E., Diekhans M., Kokocinski F., Aken B.L., Barrell D., Zadissa A., Searle S., et al. // *Genome Res.* 2012. V. 22. № 9. P. 1760–1774.
25. Kent W.J., Sugnet C.W., Furey T.S., Roskin K.M., Pringle T.H., Zahler A.M., Haussler D. // *Genome Res.* 2002. V. 12. № 6. P. 996–1006.
26. Marygold S.J., Crosby M.A., Goodman J.L. // *Meth. Mol. Biol.* 2016. V. 1478. P. 1–31.
27. Harris T.W., Arnaboldi V., Cain S., Chan J., Chen W.J., Cho J., Davis P., Gao S., Grove C.A., Kishore R., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2020. V. 48. № D1. P. D762–D767.
28. O’Leary N.A., Wright M.W., Brister J.R., Ciuffo S., Haddad D., McVeigh R., Rajput B., Robbertse B., Smith-White B., Ako-Adjei D., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2016. V. 44. № D1. P. D733–D745.
29. Slater G.S., Birney E. // *BMC Bioinformatics.* 2005. V. 6. P. 31.
30. Quinlan A.R., Hall I.M. // *Bioinformatics.* 2010. V. 26. № 6. P. 841–842.
31. Mele M., Ferreira P.G., Reverter F., DeLuca D.S., Monlong J., Sammeth M., Young T.R., Goldmann J.M., Pervouchine D.D., Sullivan T.J., et al. // *Science.* 2015. V. 348. № 6235. P. 660–665.
32. Dobin A., Davis C.A., Schlesinger F., Drenkow J., Zaleski C., Jha S., Batut P., Chaisson M., Gingeras T.R. // *Bioinformatics.* 2013. V. 29. № 1. P. 15–21.
33. Pervouchine D.D., Knowles D.G., Guigó R. // *Bioinformatics.* 2013. V. 29. № 2. P. 273–274.
34. Ramírez F., Dündar F., Diehl S., Grüning B.A., Manke T. // *Nucl. Acids Res.* 2014. V. 42 (Web Server issue). P. W187–191.
35. Frankish A., Diekhans M., Ferreira A.M., Johnson R., Jungreis I., Loveland J., Mudge J.M., Sisu C., Wright J., Armstrong J., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2019. V. 47. № D1. P. D766–D773.
36. Schmitz J., Brosius J. // *Biochimie.* 2011. V. 93. № 11. P. 1928–1934.
37. Fukuzawa A., Idowu S., Gautel M. // *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 2005. V. 26. № 6–8. P. 427–434.
38. Kontrogianni-Konstantopoulos A., Bloch R.J. // *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 2005. V. 26. № 6–8. P. 419–426.
39. Landerer S., Kalthoff S., Paulusch S., Strassburg C.P. // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. № 1. P. 8689.
40. Strassburg C.P., Kalthoff S., Ehmer U. // *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2008. V. 45. № 6. P. 485–530.
41. Chen S.T., Cheng H.C., Barbash D.A., Yang H.P. // *PLoS Genet.* 2007. V. 3. № 7. P. e107.
42. Pan H., Shi Y., Chen S., Yang Y., Yue Y., Zhan L., Dai L., Dong H., Hong W., Shi F., et al. // *RNA.* 2018. V. 24. № 11. P. 1466–1480.
43. Siepel A., Bejerano G., Pedersen J.S., Hinrichs A.S., Hou M., Rosenbloom K., Clawson H., Spieth J., Hillier L.W., Richards S., et al. // *Genome Res.* 2005. V. 15. № 8. P. 1034–1050.
44. Ivanov T.M., Pervouchine D.D. // *Genes (Basel).* 2018. V. 9. № 7. P. 356.
45. Kalmykova S., Kalinina M., Denisov S., Mironov A., Skvortsov D., Guigo R., Pervouchine D. // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. № 1. P. 2300.

УДК 577.322.24

Влияние дополнительных аминокислотных замен на свойства многоточечной мутантной бактериальной формиатдегидрогеназы PseFDH SM4S

А. А. Пометун^{1,2,3}, П. Д. Паршин^{2,3}, Н. П. Галаничева², Л. А. Шапошников²,
Д. Л. Атрошенко^{1,2,3}, Е. В. Пометун⁴, В. В. Бурмакин², С. Ю. Клейменов^{1,5}, С. С. Савин^{2,3},
В. И. Тишков^{1,2,3*}

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, 119071 Россия

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119991 Россия

³ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», Москва, 109559 Россия

⁴Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, 119991 Россия

⁵Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, 119334 Россия

*E-mail: vitishkov@gmail.com

Поступила в редакцию 17.12.2021

Принята к печати 11.02.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11665

РЕФЕРАТ Формиатдегидрогеназа из бактерий *Pseudomonas* sp. 101 (PseFDH, КФ 1.2.1.2) является модельным объектом для изучения закономерностей механизма действия ферментов суперсемейства D-специфичных дегидрогеназ 2-оксикислот. Этот фермент активно используется для регенерации восстановленной формы NAD(P)H в процессах хирального синтеза с помощью оксидоредуктаз. Ранее в нашей лаборатории был получен многоточечный мутант PseFDH SM4S, обладающий повышенной температурной и химической стабильностью. С целью улучшения свойств этого мутанта в его последовательность были введены дополнительные точечные замены, что позволило получить пять новых мутантных PseFDH. Все эти ферменты выделены в высокоочищенном виде, изучены их кинетические свойства и температурная стабильность, охарактеризованная по кинетике термоинактивации и с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии. Показано, что введение в PseFDH SM4S замены E170D приводит (при сохранении кинетических свойств) к увеличению температурной стабильности в 1.76 и 10 раз по сравнению с исходным мутантом и ферментом дикого типа соответственно.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА формиатдегидрогеназа, *Pseudomonas* sp. 101, каталитические свойства, температурная стабильность, сайт-направленный мутагенез.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ FDH – формиатдегидрогеназа; NAD(P)⁺ – никотинамидадениндинуклеотид(фосфат).

ВВЕДЕНИЕ

NAD⁺-зависимая формиатдегидрогеназа (FDH, КФ 1.2.1.2) из мезофильных бактерий *Pseudomonas* sp. 101 (PseFDH) является одним из наиболее изученных ферментов этой группы. PseFDH была одной из первых формиатдегидрогеназ, которая была получена в высокоочищенном виде и охарактеризована [1]. Ген *psefdh*, кодирующий этот фермент, был первым геном формиатдегидрогеназ бактерий, который клонировали и сверхэкспрессировали в клетках

Escherichia coli [2, 3]. Определены кристаллические структуры апо- и холо-форм PseFDH (структуры PDB2NAC, PDB2NAD, PDB2GO1 и PDB2GUG). За последние десятилетия клонировано, выделено и охарактеризовано много новых формиатдегидрогеназ, однако PseFDH остается самой термостабильной из них [4], характеризуется высокой каталитической активностью и эффективностью [5, 6]. Недавно нами была выделена и закристаллизована формиатдегидрогеназа из патогенных бактерий *Staphylococcus*

aureus (SauFDH) [7], сравнивая с PseFDH по термостабильности [4] и имеющая более высокую каталитическую активность (но не эффективность) [6].

В нашей лаборатории проводятся систематические исследования взаимосвязи структура–функция в формиатдегидрогеназах. Проведены эксперименты, подтверждающие важную роль пары остатков His332-Gln313 и остатка Arg284 в каталитическом механизме PseFDH [8, 9]. С использованием гидрофобизации альфа-спиралей получены мутантные формы с точечными заменами, повышающими термостабильность фермента [10], начаты эксперименты по изменению коферментной специфичности [11], получены мутантные формы с измененной изоэлектрической точкой [12]. Методом направленного мутагенеза исследовано влияние His-tag на N-конце аминокислотной последовательности на свойства фермента дикого типа и его NADP⁺-специфичных мутантов [13]. Проведены эксперименты по увеличению химической стабильности PseFDH, получены мутантные формы, обладающие высокой устойчивостью в присутствии пероксида водорода [14, 15].

Как следует из вышесказанного, для получения новых биокатализаторов с улучшенными даже по одному параметру свойствами необходимо объединение нескольких аминокислотных замен, обеспечивающих требуемый положительный эффект. В ряде случаев такое объединение приводит к синергическому эффекту, например, такой эффект наблюдали при комбинации аминокислотных замен, направленных на повышение термостабильности FDH из сои [16]. В случае мутантной PseFDH SM4S за счет аминокислотных замен в 311 положении были получены ферменты, у которых температурная стабильность повысилась до 2.4 раза по сравнению с исходным и более чем в 7 раз по сравнению с PseFDH дикого типа [17].

Ранее объединение замен, повышающих каталитическую активность, а также температурную и операционную стабильность, позволило нам получить вариант PseFDH SM4S. В данной работе продолжены эксперименты, направленные на дальнейшее улучшение свойств этого мутанта. С этой целью в него были введены дополнительные точечные аминокислотные замены, которые оказывали положительный эффект на свойства фермента дикого типа.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реакции направленного мутагенеза

Точечные замены аминокислот вводили с помощью двустадийной полимеразной цепной реакции (ПЦР). В качестве матрицы использовали плазмиду pPseFDH8_SM4S, в которой ген *psefdh* находится под контролем сильного промотора РНК-

полимеразы фага T7. Для введения мутаций использовали прямой (T7_for) и обратный (T7_rev) праймеры на начало и конец гена соответственно, а также прямой и обратный праймеры, несущие требуемую замену в гене *psefdhsm4*:

```
T7_for      5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'
T7_rev      5'-GCT AGT TAT TGC TCA GCG G-3'
K61R_for    5'-GGC CTG CGC CGT TAT CTC GAA TCC AAC GGC CAC ACC CTG-3'
K61R_rev    5'-GAT TCG AGA TAA CGG CGC AGG CCG AGC TCG CCG G-3'
K61P_for    5'-GGC CTG CGC CGT TAT CTC GAA TCC AAC GGC CAC ACC CTG-3'
K61P_rev    5'-GAT TCG AGA TAC GGG CGC AGG CCG AGC TCG CCG G-3'
S131A_for   5'-GTC GAT CTT CAG GCG GCT ATC GAC CGT AAC GTC ACC-3'
S131A_rev   5'-GAT AGC CGC CTG AAG ATC GAC GTG GTC-3'
S160A_for   5'-GAT GAT CCT GGC GCT GGT GCG CAA CTA TCT GCC CTC-3'
S160A_rev   5'-GCA CCA GCG CCA GGA TCA TCA TCA CCA CAT G-3'
E170D_for   5'-CCT CGC ACG ATT GGG CGC GGA AGG GCG GCT G-3'
E170D_rev   5'-CTT CCG CGC CCA ATC GTG CGA GGG CAG ATA GTT GCG CAC-3'
```

Реакционная смесь для проведения ПЦР содержала 2.5 мкл 10-кратного буфера для Pfu ДНК-полимеразы (200 мМ Трис-НСl (рН 8.8 при 25°C), 100 мМ (NH₄)₂SO₄, 100 мМ КСl, 1 мг/мл БСА, 1% (v/v) Тритон X-100, 20 мМ MgSO₄); 2.5 мкл смеси dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP, концентрация каждого 2.5 мМ); 1 мкл ДНК-матрицы (~10 нг/мкл); по 2 мкл праймеров (10 нмоль/мл); 0.5 мкл Pfu ДНК-полимеразы (2.5 Ед/мкл) и деионизованную воду до общего объема смеси 25 мкл. ПЦР проводили в тонкостенной пластиковой пробирке объемом 0.5 мл (SSI, США) на приборе Терцик («ДНК-Технологии», Россия). Для предотвращения испарения реакционной смеси в пробирку добавляли 30 мкл минерального масла. Пробирку прогревали в течение 5 мин при 95°C и затем проводили реакцию по следующей программе: денатурация – 95°C, 30 с; связывание праймеров – 54–58°C, 30 с; удлинение цепи – 72°C, 2 мин, всего 25–35 циклов. После последнего цикла реакционную смесь дополнительно выдерживали в течение 5 мин при 72°C. Температуру на второй стадии выбирали на 3–5°C ниже температуры плавления дуплексов (T_m), образуемых праймерами.

Для получения фрагментов, содержащих требуемую замену, проводили две ПЦР с использованием пар праймеров: 1) прямого PseFor, содержащего необходимую нуклеотидную(ые) замену(ы), и обратного стандартного праймера T7_rev (фрагмент 1) и 2); стандартного прямого праймера T7_for и обратного праймера PseRev, также содержащего необходимую нуклеотидную(ые) замену(ы) (фрагмент 2). Продукты двух ПЦР очищали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле с последующим выделением фрагментов ДНК из геля. На следующем этапе проводили третью, объединяющую, ПЦР с праймерами T7_for и T7_rev, где в качестве ДНК-матрицы использовали оба полученных ранее фрагмента. Продукт объединяющей ПЦР очищали таким же образом, а затем обрабатывали эндону-

клеазами рестрикции NdeI и XhoI. Этими же рестриктазами обрабатывали плазмиду PseFDH_SM4S для удаления из нее фрагмента гена, в который вводили мутацию. Обработанный рестриктазами продукт ПЦР и плазмиду очищали с помощью электрофореза и проводили лигирование. Полученной после реакции лигирования смесью трансформировали клетки *E. coli* DH5 α . Введение требуемых мутаций контролировали с помощью секвенирования плазмидной ДНК в Центре коллективного пользования «Геном» (Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН) или в Центре коллективного пользования ФИЦ Биотехнологии РАН.

Экспрессия новых мутантных PseFDH в клетках *E. coli*

PseFDH дикого типа и мутантные варианты экспрессировали в клетках *E. coli* BL21(DE3)/pLysS. Для получения штамма-продуцента клетки трансформировали соответствующей плазмидой и высевали на чашки Петри с агаризованной средой, содержащей ампициллин (100 мкг/мл) и хлорамфеникол (25 мкг/мл). Для приготовления посевного материала с чашки отбирали единичную колонию и культивировали в 5 мл среды 2YT (дрожжевой экстракт 10 г/л, бактотриптон 16 г/л, хлорид натрия 5 г/л, pH 7.0) в присутствии 150 мкг/мл ампициллина и 25 мкг/мл хлорамфеникола в течение 7–9 ч при 30°C и 180 об/мин до достижения величины поглощения на длине волны 600 нм $A_{600} \approx 0.6–0.8$. Затем 2 мл ночной культуры переносили в конические качалочные колбы с отбойниками объемом 100 мл, содержащими 20 мл среды 2YT и 150 мкг/мл ампициллина, клетки культивировали при 37°C и 120 об/мин до достижения величины поглощения $A_{600} = 0.6–0.8$. Клетки пересевали в конические колбы с отбойниками, содержащими 230 мл среды 2YT без антибиотиков, культивировали при 30°C до достижения величины поглощения $A_{600} \approx 0.6–0.8$. Далее клетки индуцировали, добавляя в среду для культивирования раствор лактозы (300 г/л) до конечной концентрации индуктора 20 г/л. После индукции клетки культивировали в течение 17 ч при 120 об/мин и 30°C. Полученную биомассу осаждали на центрифуге Beckman J-21 (США) при 7500 об/мин в течение 20 мин при 4°C, после удаления культуральной жидкости клетки ресуспендировали в 0.1 М натрий-фосфатном буфере pH 8.0 в соотношении 1 : 4 (масс.). Полученную суспензию замораживали и хранили при -20°C.

Выделение и очистка

Клетки после культивирования разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе. Клеточный дебрис

осаждали центрифугированием (Eppendorf 5804 R, 40 мин, +4°C, 12000 об/мин), а к полученному бесклеточному экстракту добавляли насыщенный раствор сульфата аммония (конечная концентрация 35% от насыщения) в 0.1 М натрий-фосфатном буфере, 0.01 М EDTA, pH 7.0 (раствор А) и оставляли на 4–8 ч при +4°C. Нерастворившиеся белки осаждали на центрифуге Eppendorf 5804 R в стаканах объемом 50 мл (11000 об/мин, +4°C), а полученный супернатант наносили на колонку 1.0 \times 10 см с высокозамещенной Phenyl Sepharose FastFlow (Pharmacia Biotech, Австрия), уравновешенной раствором А. После нанесения фермента колонку промывали раствором А до исчезновения поглощения на 280 нм. Фермент элюировали с колонки нисходящим линейным градиентом сульфата аммония (35–0% от насыщения, 0.1 М фосфатный буфер, 0.01 М EDTA, pH 7.0, общий объем 150 мл). Во время проведения хроматографии собирали фракции по 5 мл, измеряли поглощение на 280 и 260 нм (A_{280} и A_{260}) и ферментативную активность (А), отбирали фракции с максимальным соотношением (A/A_{280}). Обессоливание проводили на колонке 2.5 \times 10 см (объем 25 мл) с Sephadex G25 Fine (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция), уравновешенной буфером 0.1 М Na-фосфат, 0.01 М EDTA, pH 7.0. Собирали фракции по 0.5 мл, в каждой фракции определяли ферментативную активность и поглощение на 280 нм. Чистоту препаратов контролировали с помощью аналитического электрофореза в 12% полиакриламидном геле в присутствии 0.1% додецилсульфата натрия на приборе для электрофореза MiniProtean II фирмы BioRad согласно протоколу производителя. Концентрацию фермента в пробах рассчитывали из величины поглощения 1.6 для 0.1% раствора очищенной PseFDH на длине волны 280 нм.

Измерение активности форматдегидрогеназы

Активность FDH определяли спектрофотометрически по накоплению NADH на длине волны 340 нм ($\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) на спектрофотометре Shimadzu UV1800 PC при 30°C в 0.1 М натрий-фосфатном буфере, pH 7.0. Концентрация формиата натрия и NAD⁺ в кювете составляла 0.6 М и 1 мг/мл соответственно.

Определение константы Михаэлиса

Константы Михаэлиса по NAD⁺ и формиату определяли из зависимостей активности фермента от концентрации (0.4–6 K_M) соответствующего субстрата. Концентрация второго субстрата была насыщающей (>15 K_M). Точную концентрацию исходного раствора NAD⁺ определяли спектрофотометрически на длине волны 260 нм ($\epsilon_{260} = 17800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Раствор фор-

миата натрия с заданной концентрацией готовили, растворяя нужное количество субстрата в 0.1 М натрий-фосфатном буфере, pH 7.0. Объем раствора доводили до метки в мерной колбе. Значения K_m рассчитывали из экспериментальных зависимостей методом нелинейной регрессии с помощью программы Origin Pro 2015.

Изучение кинетики термоинактивации

Термостабильность ферментов измеряли в 0.1 М натрий-фосфатном буфере pH 7.0 при нескольких температурах. Пробирки объемом 0.5 мл, содержащие по 100 мкл раствора фермента (0.2 мг/мл), помещали в предварительно прогретый до необходимой температуры водный термостат (точность термостатирования $\pm 0.1^\circ\text{C}$). В определенные моменты времени отбирали по одной пробирке и переносили в лед на 5 мин, после чего пробирку центрифугировали в течение 3 мин при 12000 об/мин на центрифуге Eppendorf 5415D. Остаточную активность FDH измеряли в трех повторах как описано выше. Константу скорости термоинактивации k_{in} определяли как тангенс угла наклона прямой зависимости натурального логарифма величины остаточной активности от времени (полулогарифмические координаты $\ln(A/A_0) - t$) методом линейной регрессии, используя программу Origin Pro 8.1.

Определение температурной стабильности методом дифференциальной сканирующей калориметрии

Исследование температурной стабильности проводили на дифференциальном адиабатическом сканирующем микрокалориметре Nano DSC (TA Instruments, США). Рабочий объем капиллярных калориметрических платиновых ячеек составлял 300 мкл. Для предотвращения образования пузырьков и закипания растворов при повышении температуры в ячейках калориметра поддерживали избыточное давление, равное 3 атм. Перед проведением эксперимента определяли значения инструментальной базовой линии, которые затем вычитали из данных, полученных для белка. При измерениях в контрольную ячейку помещали буферный раствор, а в рабочую – раствор исследуемой FDH в том же буферном растворе. Концентрация ферментов составляла 1–2 мг/мл, а скорость прогрева – $1^\circ\text{C}/\text{мин}$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор остатков для направленного мутагенеза

Ключевыми аминокислотными заменами в мутанте PseFDH SM4S являются замены C145S, C255A и A198G. Первые две замены позволили защитить

активный центр PseFDH от химической модификации и(или) окисления существенных остатков цистеина. Замена C255A привела к тому, что через 90 дней хранения при 25°C мутантный фермент сохранял более 60% исходной активности, в то время как PseFDH дикого типа за это время полностью инактивировалась [14]. Двойная замена C145S и C255A снизила константу скорости инактивации фермента в присутствии 100 мМ пероксида водорода почти в 100 раз [15]. Замена A198G обеспечивает снижение напряжения структуры PseFDH в повороте полипептидной цепи, соединяющем тяж бета-листа βA и спираль αB в коферментсвязывающем домене активного центра. Такая замена приводила к увеличению термостабильности в 2.6 раза и улучшению константы Михаэлиса по NAD^+ почти в 2 раза [11]. Поэтому основным направлением исследования по улучшению свойств PseFDH SM4S было увеличение температурной стабильности.

Замены остатка Lys61

Увеличение pH среды с 7.0 до 8.0 приводит к увеличению константы скорости термоинактивации PseFDH в 6 раз [18]. Это может быть связано с разрушением ионных пар при повышении pH, например, за счет потери положительного заряда ϵ -аминогруппы остатка лизина. Ранее при изучении термостабильности FDH из бактерий *Mycobacterium vaccae* N10 (отличается от PseFDH всего двумя заменами, одна из которых Glu61 в MysFDH и K61 в PseFDH, а по термостабильности первая хуже второй в 4 раза) показали, что замены Glu61K (переход к PseFDH) и Glu61Pro позволяют получить мутантную MysFDH по стабильности очень близкую к PseFDH [19]. Анализ структур апо- и холо-PseFDH (PDB2NAC и PDB2NAD соответственно) показывает, что аминокислотная группа остатка K61 образует ионную пару с карбоксильной группой Asp43. Введение в положение 61 остатка Pro с таким же стабилизационным эффектом, как у Lys61, означает, что в мутанте с заменой K61P при повышении pH не должно происходить разрушение ионной пары, отвечающей за поддержание структуры стабильного фермента. Кроме того, решено также ввести замену K61R, поскольку при повышении pH минимум до 12, его гуанидиниевая группа будет сохранять положительный заряд.

Гидрофобизация остатков S131 и S160

Подход по стабилизации белков, основанный на гидрофобизации α -спиралей, известен достаточно давно [20]. Наиболее часто в α -спиралях проводят замены Ser/Ala – подход достаточно универсальный и эффективный для большого количества белков.

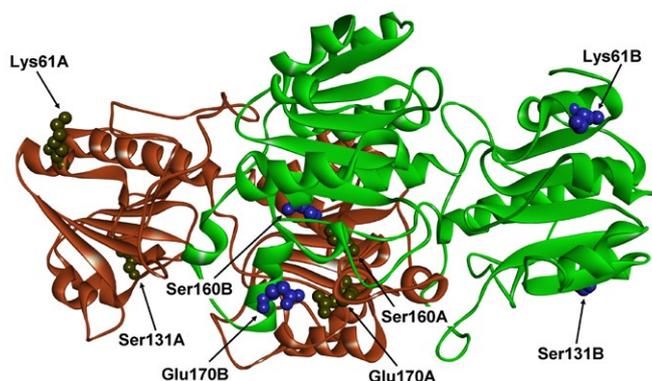


Рис. 1. Положения остатков Lys61, Ser131, Ser160 и Glu170 в структуре апо-формы FDH из *Pseudomonas* sp. 101 (PDB2NAC)

Например, с помощью этого подхода мы в несколько раз увеличили термостабильность оксидазы D-аминокислот [21]. Анализ структуры PseFDH выявил пять остатков Ser в α -спиралях, из которых один оказался консервативным. Замена остальных четырех остатков показала, что наибольший стабилизирующий эффект (около 20% каждый) давали замены S131A и S160A [10]. Именно эти замены и были выбраны для введения в PseFDH SM4S.

Замена Glu170Asp

Остаток Glu170 расположен в центре белковой глобулы в области межсубъединичного контакта (рис. 1). При этом отрицательно заряженные атомы кислорода карбоксильной группы остатка Glu170A одной субъединицы расположены на расстоянии всего 2.67 Å от атомов кислорода в карбоксильной группе Glu170B второй субъединицы (рис. 1). Простое удаление карбоксильных групп крайне нецелесообразно, поскольку эти же группы участвуют

в электростатических взаимодействиях, в частности, с гуанидиниевой группой остатков Arg173 из субъединиц A и B (расстояние 2.64 Å). Поэтому для уменьшения взаимного отталкивания без сильного изменения остальной системы взаимодействий Glu170 был заменен на Asp, который короче остатка Glu на одну CH_2 -группу [22]. Отметим, что в положении 170 в FDH бактерий *Moraxella* sp. C2 (гомология с PseFDH 84%) расположены именно остатки Asp [23, 24]. Замена в PseFDH E170D привела к повышению термостабильности фермента на 40% [22].

Таким образом, в результате анализа выбрали пять аминокислотных замен в четырех положениях. Положение остатков для направленного мутагенеза показано на рис. 1. Отметим, что они расположены как на поверхности, так и внутри белковой глобулы, включая область межсубъединичного контакта, которая недоступна молекулам растворителя. Каждая из замен в случае PseFDH дикого типа не давала значительного увеличения стабильности (максимум до 40%), однако результаты наших предыдущих экспериментов позволяют предполагать наличие синергического эффекта, и эффект стабилизации при введении выбранных замен может быть выше.

Получение мутантных форм PseFDH SM4S

Новые мутантные PseFDH SM4S получены согласно методике, приведенной в «Экспериментальной части». Результаты секвенирования показали, что целевые гены содержат только запланированные нуклеотидные замены. Результаты экспрессии представлены в табл. 1. Для контроля параллельно экспрессировали исходную PseFDH SM4S и фермент дикого типа. Полученные данные позволяют сделать вывод, что используемая нами методика экспрессии PseFDH дикого типа применима и для получения новых мутантных форм. Выделение и очистку мутантных PseFDH проводили по стандартной мето-

Таблица 1. Экспрессия мутантных форм PseFDH и фермента дикого типа в клетках *E. coli*

Фермент	Выход фермента, активность, Ед/л среды	Выход биомассы, г/л среды	Выход фермента по массе*, мг/л среды	Содержание фермента в клетках, Ед/г
PseFDH wt	3875	13.5	388	287
PseFDH SM4S	5430	12.0	543	462
PseFDH SM4S K61P	4865	17.0	487	300
PseFDH SM4S K61R	4575	17.2	458	265
PseFDH SM4S S131A	5200	20.0	520	213
PseFDH SM4S S160A	5450	17.0	545	315
PseFDH SM4S E170D	6300	17.0	630	358

*Выход фермента на 1 л среды рассчитывали исходя из выхода по активности (столбец 2) и величины удельной активности 10 Ед/мг белка.

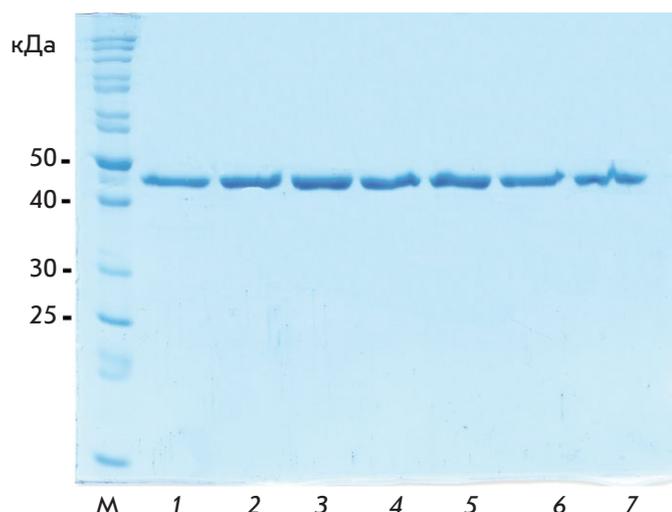


Рис. 2. Аналитический электрофорез в 12% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия препаратов ферментов после очистки.

М – маркер молекулярной массы; 1 – PseFDH дикого типа; 2 – PseFDH SM4S; 3 – PseFDH SM4S K61P; 4 – PseFDH SM4S E170D; 5 – PseFDH SM4S K61R; 6 – PseFDH SM4S S131A; 7 – PseFDH SM4S S160A

дикое, разработанной в нашей лаборатории ранее [8]. На рис. 2 представлены результаты аналитического электрофореза препаратов мутантных форм PseFDH. Видно, что каждый препарат представлен единственной полосой, что свидетельствует об отсутствии примесей. Таким образом, получены препараты ферментов чистотой не менее 99%.

Кинетические свойства мутантных ферментов

Значения каталитических констант и констант Михаэлиса по NAD^+ и HCOO^- для всех полученных мутантных PseFDH приведены в табл. 2. Отметим, что наблюдаемая каталитическая константа у всех форм PseFDH в пределах ошибки эксперимента

не изменилась. Небольшое увеличение константы Михаэлиса по формиату отмечено после замены S131A (на 60 и 40% по сравнению с исходной PseFDH SM4S и с ферментом дикого типа соответственно). Сходным образом на величину K_M по формиату влияет и замена K61R. Константы Михаэлиса по NAD^+ у полученных мутантов в пределах ошибки эксперимента не отличаются (увеличение на 10–20% и уменьшение на 15–35% по сравнению с K_M для PseFDH SM4S и фермента дикого типа соответственно). Как следствие таких изменений, каталитическая эффективность $k_{\text{cat}}/K_M^{\text{NAD}^+}$ у всех мутантов была в 1.4 раза меньше по сравнению с PseFDH SM4S и не отличалась от таковой для фермента дикого типа. Величина $k_{\text{cat}}/K_M^{\text{HCOO}^-}$ немного увеличилась после введения в PseFDH SM4S замен K61P и S160A. В целом, следует отметить, что введение замен не повлияло заметным образом на каталитические свойства фермента.

Температурная стабильность мутантных форм PseFDH

Термостабильность мутантных PseFDH изучали в диапазоне температур 65–69°C. В этом диапазоне термоинактивация фермента дикого типа протекает необратимо по мономолекулярному механизму в соответствии с кинетикой реакций первого порядка [19]. На рис. 3А в качестве примера в полулогарифмических координатах представлены зависимости остаточной активности мутантной PseFDH SM4S E170D от времени. Видно, что эти зависимости хорошо линеаризуются в полулогарифмических координатах, т.е. процесс инактивации протекает в соответствии с кинетикой реакций первого порядка. Из тангенса угла наклона прямых рассчитывается наблюдаемая константа скорости термоинактивации k_{in} первого порядка. На рис. 3Б представлены зависимости остаточной активности всех изучен-

Таблица 2. Кинетические параметры мутантных PseFDH и фермента дикого типа

Фермент	$k_{\text{cat}}, \text{c}^{-1}$	$K_M^{\text{HCOO}^-}, \text{mM}$	$K_M^{\text{NAD}^+}, \text{mM}$	$k_{\text{cat}}/K_M^{\text{NAD}^+}, (\text{M}^{-1}\text{c}^{-1}) \times 10^6$	$k_{\text{cat}}/K_M^{\text{HCOO}^-}, (\text{M}^{-1}\text{c}^{-1}) \times 10^3$
PseFDH wt	7.3 ± 0.3	1.63 ± 0.08	52.5 ± 2.5	0.14	4.47
PseFDH SM4S	7.3 ± 0.3	1.36 ± 0.14	35.5 ± 1.5	0.21	5.37
PseFDH SM4S K61P	7.3 ± 0.3	1.19 ± 0.08	48.3 ± 1.7	0.15	6.13
PseFDH SM4S K61R	7.7 ± 0.4	1.89 ± 0.11	45.8 ± 2.0	0.17	4.07
PseFDH SM4S S131A	7.5 ± 0.4	2.31 ± 0.15	48.6 ± 1.6	0.15	3.25
PseFDH SM4S S160A	7.3 ± 0.3	1.22 ± 0.12	48.6 ± 2.7	0.15	5.98
PseFDH SM4S E170D	7.3 ± 0.3	1.11 ± 0.08	41.0 ± 1.7	0.18	6.58

Примечание. 0.1 М натрий-фосфатный буфер, 0.01 М EDTA, pH 7.0, 30°C.

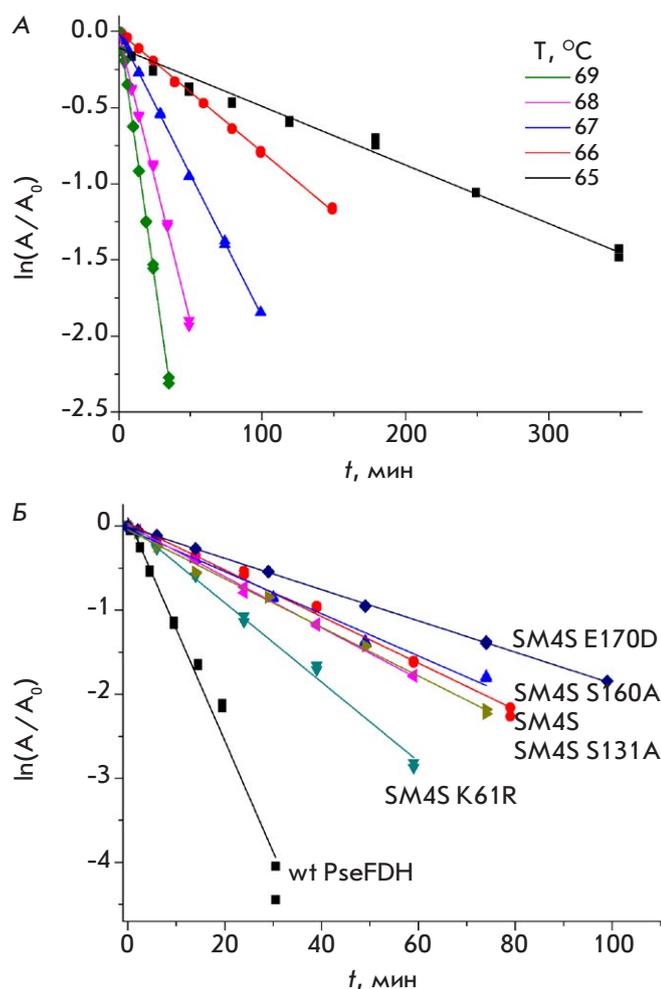


Рис. 3. А – зависимость остаточной активности PseFDH SM4S E170D от времени в координатах $\ln(A/A_0) - t$, при различных температурах. Б – зависимости остаточной активности PseFDH дикого типа и ее различных мутантов от времени в координатах $\ln(A/A_0) - t$, при 67°C. 0.1 М натрий-фосфатный буфер, pH 7.0

ных ферментов от времени в полулогарифмических координатах при 67°C. Из рис. 3Б хорошо видно, что наибольший эффект стабилизации вызывает замена E170D в PseFDH SM4S. Замена K61R приводит к небольшой дестабилизации по сравнению с PseFDH SM4S, но все равно стабильность этого мутанта была выше, чем у фермента дикого типа. Остальные мутанты обладают стабильностью, сходной со стабильностью PseFDH SM4S (рис. 3Б).

Интересные данные получены при анализе зависимости наблюдаемой константы скорости термоинактивации от температуры. Истинно мономолекулярный характер процесса инактивации PseFDH во всем диапазоне температур позволяет применить для анализа этого процесса теорию активированного комплекса (ТАК).

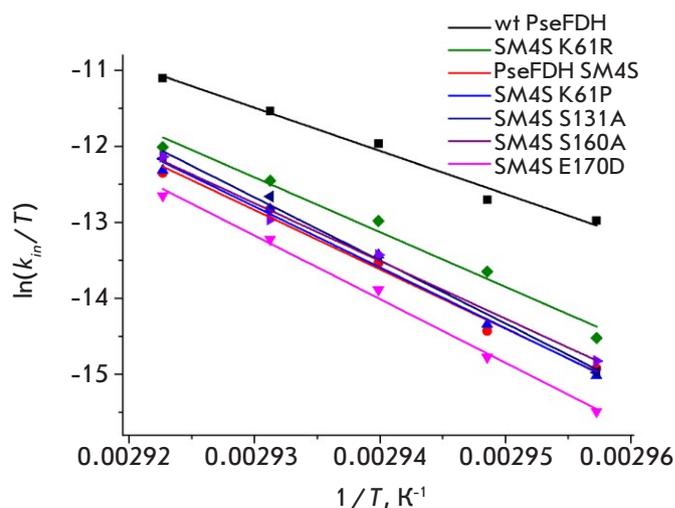


Рис. 4. Зависимости наблюдаемых констант скорости термоинактивации фермента дикого типа и мутантных PseFDH от температуры в координатах $\ln(k_{in}/T) - 1/T$. 0.1 М натрий-фосфатный буфер, pH 7.0

Согласно теории активированного комплекса, уравнение зависимости наблюдаемой константы скорости термоинактивации от температуры имеет следующий вид:

$$k_{in} = \frac{k_B T}{h} \cdot e^{-\left(\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}\right)} = \frac{k_B T}{h} \cdot e^{-\left(\frac{\Delta H^\ddagger}{RT} - \frac{\Delta S^\ddagger}{R}\right)},$$

где $k_B = 1.238 \times 10^{-23}$ Дж/К – постоянная Больцмана; $h = 6.634 \times 10^{-34}$ Дж/с⁻¹ – постоянная Планка; $R = 8.314$ Дж/моль/К – универсальная газовая постоянная.

Это уравнение можно представить в линейной форме:

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

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

Зависимость в координатах $\ln(k_{in}/T) - 1/T$ представляет собой прямую с тангенсом угла наклона, равным $\Delta H^\ddagger/R$. На рис. 4 представлены экспериментальные зависимости наблюдаемой константы скорости термоинактивации от температуры для всех полученных мутантов PseFDH. Из рис. 4 видно, что во всех случаях характер зависимости k_{in} примерно такой же, как и у исходной PseFDH SM4S. С помощью ТАК рассчитаны значения энтальпии (ΔH^\ddagger) и энтропии (ΔS^\ddagger) активации. Величина ΔS^\ddagger может быть получена из тангенса угла наклона зависимости ΔG^\ddagger от температуры согласно уравнению:

Таблица 3. Параметры процесса термоинактивации мутантных PseFDH и фермента дикого типа

Фермент	ΔH^\ddagger , кДж/моль	ΔS^\ddagger , Дж/моль/К	$\Delta H_{ДСК}$, кДж/моль	Температура фазового перехода, T_m , °C
PseFDH wt	470 ± 35	1100 ± 100	1470	68.3
PseFDH SM4S	650 ± 40	1600 ± 100	1975	70.9
PseFDH SM4S K61P	665 ± 40	1650 ± 100	1880	70.9
PseFDH SM4S K61R	600 ± 40	1450 ± 100	нд	нд
PseFDH SM4S S131A	630 ± 50	1720 ± 100	нд	нд
PseFDH SM4S S160A	690 ± 35	1550 ± 100	нд	нд
PseFDH SM4S E170D	700 ± 30	1730 ± 100	2070	71.4

Примечание. нд – нет данных. 0.1 М натрий-фосфатный буфер, pH 7.0.

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

Для нахождения энергии Гиббса активации использовано следующее выражение:

$$\Delta G^\ddagger = RT \left[\ln \left(\frac{k_b}{h} \right) - \ln \left(\frac{k_m}{T} \right) \right] = RT \ln \left(\frac{k_b T}{k_m h} \right)$$

Из табл. 3 видно, что значения ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger у полученных мутантных форм и исходной PseFDH SM4S примерно одинаковы и достоверно выше, чем у фермента дикого типа. Наиболее высокое значение ΔH^\ddagger наблюдается в случае мутанта с самым высоким эффектом стабилизации – PseFDH SM4S E170D (табл. 3).

Термостабильность некоторых наиболее интересных мутантных форм PseFDH также изучена методом дифференциальной сканирующей калориметрии. Так как мутанты обладали сходной стабильностью, то исследование термостабильности методом ДСК было сделано для фермента дикого типа, исходной PseFDH SM4S и ее вариантов с дополнительными заменами E170D и K61P (замены S131A и S160A давали близкий стабилизационный эффект). Результаты приведены на рис. 5. Численные значения теплоты плавления и температуры фазового перехода, рассчитанные из кривых плавления, представлены в табл. 3. Из рис. 5 и табл. 3 видно, что замена E170D приводит к самому большому повышению температуры максимума кривой плавления (на 0.5°C) по сравнению с исходной PseFDH SM4S. Такое увеличение хорошо согласуется с величиной эффекта стабилизации, наблюдаемого в экспериментах по изучению кинетики термоинактивации. Также замена E170D вызывает повышение удельной теплоты фазового перехода по сравнению с другими изученными мутантами и ферментом дикого типа (табл. 3), что согласуется с результатами анализа кинетики термоинактивации с помощью

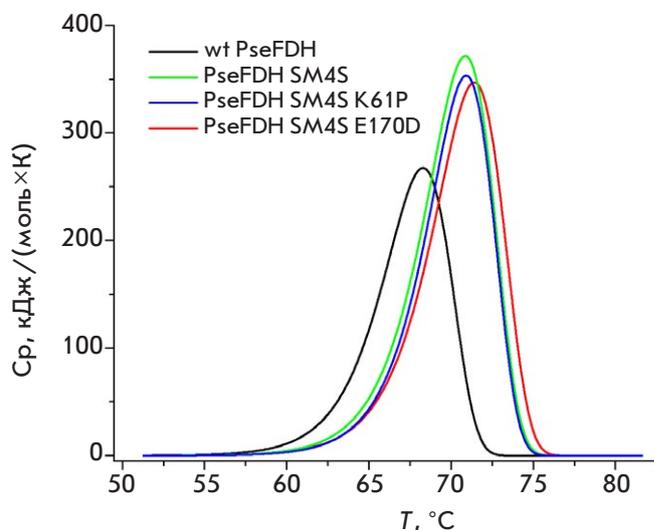


Рис. 5. Кривые плавления, полученные методом ДСК, для PseFDH дикого типа и мутантных ферментов. 0.1 М натрий-фосфатный буфер, 0.01 М EDTA, pH 7.0. Концентрация белка 2 мг/мл, скорость сканирования 1 град/мин

теории активированного комплекса. Таким образом, результаты экспериментов по исследованию термостабильности новых мутантных PseFDH двумя различными методами очень хорошо согласуются друг с другом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В табл. 4 приведены величины относительной термостабильности новых полученных мутантных ферментов по сравнению к PseFDH дикого типа и к исходному мутанту PseFDH SM4S (значения в скобках) при различных температурах. Сравнение наблюдаемых значений эффектов стабилизации позволяют сделать несколько выводов.

1. Замены в положении 61 подтвердили важность остатка K61 в поддержании активной структуры

Таблица 4. Значения эффекта стабилизации* мутантных ферментов по отношению к PseFDH дикого типа и PseFDH SM4S при различных температурах

Фермент	Эффект стабилизации, k_{in}^{wt}/k_{in}^{mut} ($k_{in}^{SM4S}/k_{in}^{mut}$)				
	Температура, °C				
	65	66	67	68	69
PseFDH wt	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
PseFDH SM4S	7.03(1.0)	5.59(1.0)	4.86(1.0)	3.78(1.0)	3.62(1.0)
PseFDH SM4S K61R	4.43(0.63)	2.58(0.56)	2.75(0.57)	2.5(0.59)	2.48(0.61)
PseFDH SM4S K61P	7.70(1.1)	5.16(0.92)	4.30(0.90)	3.5(0.97)	3.4(0.97)
PseFDH SM4S S131A	7.39(1.05)	4.13(0.93)	4.5(0.93)	4.2(1.15)	2.9(0.83)
PseFDH SM4S S160A	6.35(0.90)	4.13(0.93)	4.3(0.90)	3.1(0.95)	2.81(0.81)
PseFDH SM4S E170D	12.40(1.76)	7.95(1.41)	6.85(1.42)	5.4(1.49)	4.7(1.35)

*Эффект стабилизации рассчитан как отношение наблюдаемой константы скорости термоинактивации мутантно-го фермента к наблюдаемой константе скорости термоинактивации PseFDH дикого типа при данной температуре (k_{in}^{wt}/k_{in}^{mut}). В скобках приведены соответствующие отношения $k_{in}^{SM4S}/k_{in}^{mut}$, в которых в качестве базовой была взята наблюдаемая константа скорости термоинактивации PseFDH SM4S.

0.1 М натрий-фосфатный буфер, 0.01 М EDTA, pH 7.0.

PseFDH. Несмотря на то что замена K61R привела к дестабилизации по сравнению с исходной PseFDH SM4S, стабильность такого мутанта была выше, чем у фермента дикого типа. Как уже отмечалось, введение в положение 61 остатка Pro вместо Lys имело целью удалить ионную пару без потери стабильности. Наши результаты подтвердили правильность этой гипотезы при pH 7.0. Также предполагалось, что удаление ионной пары может привести к повышению термостабильности фермента при повышении pH среды до 8.0. Данные предварительных экспериментов показали, что введение замены K61P в PseFDH SM4S при pH 8.0 и стандартной 0.1 М концентрации фосфатного буфера действительно приводит к снижению наблюдаемой константы скорости термоинактивации по сравнению с исходным ферментом. Однако работа в этом направлении будет продолжена в более широком диапазоне концентраций буфера, поскольку замена A198G в PseFDH SM4S вызывает изменение профиля зависимости константы скорости термоинактивации от концентрации буфера по сравнению с ферментом дикого типа [18].

2. Замены S131A, S160A не вызывают достоверного изменения в термостабильности PseFDH SM4S. Это, по-видимому, связано с тем, что даже в ферменте дикого типа эффект стабилизации составляет не более 20%, и такой эффект можно не зафиксировать в случае PseFDH SM4S, поскольку ее термостабильность при температурах 65–69°C в 3.6–7.0 раза выше, чем у PseFDH дикого типа.

3. Замена E170D в более термостабильной PseFDH SM4S вызывает при температуре 65°C в 2 раза больший эффект стабилизации белковой глобулы по сравнению с ферментом дикого типа, т.е. мы имеем сильный синергический эффект (200%). Кроме того, более высокая энтальпия активации ΔH^\ddagger (700 и 470 кДж/моль у PseFDH SM4S E170D и фермента дикого типа соответственно) приводит к тому, что при температурах практического применения фермента (25–40°C) величина наблюдаемой константы скорости инактивации полученного мутанта будет в несколько тысяч (!!!) раз меньше, чем у фермента дикого типа. Полученный мутантный фермент при этих температурах будет в несколько сотен раз более стабильным даже по сравнению с исходной PseFDH SM4S.

4. Поскольку четыре точечные замены – K61P, S131A, S160A, E170D, как минимум, не изменяют (а даже увеличивают) термостабильность, а также очень незначительно влияют на кинетические параметры по сравнению с PseFDH SM4S, это открывает возможность объединения всех замен в многоточечные мутанты. Сильный синергический эффект после введения в PseFDH SM4S замены E170D подтверждает необходимость получения именно многоточечных мутантов, поскольку при объединении мутаций в одном ферменте нельзя исключить возникновения такого эффекта и в случае трех других аминокислотных замен. Предварительные расчеты по моделированию новых замен (данные будут представлены в отдель-

ной статье) показывают, что есть еще одна возможная замена, введение которой может привести к увеличению химической стабильности и заметному улучшению констант Михаэлиса как по NAD^+ , так и по формиату. Работы в этом направлении обязательно будут продолжены. ●

Работа выполнена частично при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – докторов наук (конкурс – МД-2021) МД-349.2021.1.4 и частично в рамках государственного задания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Egorov A.M., Avilova T.V., Dikov M.M., Popov V.O., Rodionov Y.V., Berezin I.V. // Eur. J. Biochem. 1979. V. 99. № 3. P. 569–576. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1979.tb13289.x>.
2. Tishkov V.I., Galkin A.G., Egorov A.M. // Dokl. USSR Acad. Sci. 1991. V. 317. № 3. P. 745–748.
3. Tishkov V.I., Galkin A.G., Marchenko G.N., Tsygankov Y.D., Egorov A.M. // Biotechnol. Appl. Biochem. 1993. V. 18. P. 201–207. DOI: 10.1111/j.1470-8744.1993.tb00266.x
4. Pometun A.A., Kleymenov S.Yu., Zarubina S.A., Kargov I.S., Parshin P.D., Sadykhov E.G., Savin S.S., Tishkov V.I. // Moscow Univ. Chem. Bull. 2018. V. 73. № 2. P. 80–84. DOI: 10.3103/S002713141802013X
5. Tishkov V.I., Popov V.O. // Biomol. Eng. 2006. V. 23. № 2–3. P. 89–110. DOI: 10.1016/j.bioeng.2006.02.003
6. Tishkov V.I., Pometun A.A., Stepashkina A.V., Fedorchuk V.V., Zarubina S.A., Kargov I.S., Atroshenko D.L., Parshin P.D., Kovalevski R.P., Boiko K.M., et al. // Moscow Univ. Chem. Bull. 2018. V. 73. № 2. P. 1–6. DOI: 10.3103/S0027131418020153
7. Pometun A.A., Boyko K.M., Yurchenko T.S., Nikolaeva A.Yu., Atroshenko D.L., Savin S.S., Popov V.O., Tishkov V.I. // Biochemistry (Moscow). 2020. V. 85. № 6. P. 689–696. DOI: 10.1134/S0006297920060061
8. Tishkov V.I., Matorin A.D., Rojkova A.M., Fedorchuk V.V., Savitsky A.P., Dementieva L.A., Lamzin V.S., Mezentzev A.V., Popov V.O. // FEBS Lett. 1996. V. 390. № 1. P. 104–108. DOI: 10.1016/0014-5793(96)00641-2
9. Galkin A.G., Kutsenko A.S., Bajulina N.P., Esipova N.G., Lamzin V.S., Mezentzev A.V., Shelukho D.V., Tikhonova T.V., Tishkov V.I., Ustinnikova T.B., et al. // Biochim. Biophys. Acta. 2002. V. 1594. № 1. P. 136–149. DOI: 10.1016/s0167-4838(01)00297-7
10. Rojkova A.M., Galkin A.G., Kulakova L.B., Serov A.E., Savitsky P.A., Fedorchuk V.V., Tishkov V.I. // FEBS Lett. 1999. V. 445. № 1. P. 183–188. DOI: 10.1016/S0014-5793(99)00127-1
11. Alekseeva A.A., Fedorchuk V.V., Zarubina S.A., Sadykhov E.G., Matorin A.D., Savin S.S., Tishkov V.I. // Acta Naturae. 2015. V. 7. № 1(24). P. 60–69. DOI: <https://doi.org/10.32607/20758251-2015-7-3-55-64>
12. Alekseeva A.A., Petrov A.S., Fedorchuk V.V., Fedorchuk E.A., Osipova T.A., Tishkov V.I. // Moscow Univ. Chem. Bull. 2014. V. 69. № 2. P. 73–79. DOI: 10.3103/S0027131414020023
13. Pometun A.A., Parshin P.D., Galanicheva N.P., Uporov I.V., Atroshenko D.L., Savin S.S., Tishkov V.I. // Moscow Univ. Chem. Bull. 2020. V. 75. № 4. P. 250–257. DOI: 10.3103/S0027131420040057
14. Одинцева Е.Р., Попова А.С., Рожкова А.М., Тишков В.И. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2002. Т. 43. № 6. С. 356–359.
15. Savin S.S., Tishkov V.I. // Acta Naturae. 2010. V. 2. № 1(4). P. 97–101. DOI: 10.32607/20758251-2010-2-1-97-101
16. Alekseeva A.A., Kargov I.S., Kleimenov S.Yu., Savin S.S., Tishkov V.I. // Acta Naturae. 2015. V. 7. № 3(26). P. 55–64. DOI: 10.32607/20758251-2015-7-3-55-64
17. Tishkov V.I., Goncharenko K.V., Alekseeva A.A., Kleymenov S.Yu., Savin S.S. // Biochemistry (Moscow). 2015. V. 80. № 13. P. 1690–1700. DOI: 10.1134/S000629791513005
18. Voinova N.S., Savin S.S., Alekseeva A.A., Skirgello O.E., Tishkov V.I. // Moscow Univ. Chem. Bull. 2008. V. 63. № 2. P. 60–62. DOI: 10.3103/S0027131408020028
19. Fedorchuk V.V., Galkin A.G., Yasny I.E., Kulakova L.B., Rojkova A.M., Filippova A.A., Tishkov V.I. // Biochemistry (Moscow). 2002. V. 67. № 10. P. 1145–1151. DOI: 10.1023/A:1020915324159
20. Munoz V., Serrano L. // J. Mol. Biol. 1995. V. 245. № 3. P. 275–296. DOI: 10.1006/jmbi.1994.0023
21. Golubev I.V., Komarova N.V., Ryzhenkova K.V., Chubar T.A., Savin S.S., Tishkov V.I. // Acta Naturae. 2014. V. 6. № 3(22). P. 76–88. DOI: 10.32607/20758251-2014-6-3-76-88
22. Федорчук В.В. Повышение термостабильности бактериальной формиатдегидрогеназы методом направленного мутагенеза: Дис. ... канд. хим. наук. М.: МГУ им М.В. Ломоносова, 2000.
23. Shabalin I.G., Filippova E.V., Polyakov K.M., Sadykhov E.G., Safonova T.N., Tikhonova T.V., Tishkov V.I., Popov V.O. // Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 2009. V. 65. № 12. P. 1315–1325. DOI: 10.1107/S0907444909040773
24. Shabalin I.G., Polyakov K.M., Tishkov V.I., Popov V.O. // Acta Naturae. 2009. V. 1. № 3. P. 89–93. DOI: 10.32607/20758251-2009-1-3-89-93

УДК 576.54

Метод получения трехмерных клеточных сфероидов: универсальный инструмент для изучения цитотоксических свойств противоопухолевых соединений *in vitro*

А. С. Согомонян^{1,2}, В. О. Шипунова^{1,2,3,4*}, В. Д. Соловьев^{1,4}, В. И. Ларионов¹,
П. А. Котельникова^{1,4}, С. М. Деев^{1,2}

¹Институт биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

²Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва, 115409 Россия

³Научно-технологический университет «Сириус», Сочи, 354340 Россия

⁴Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, 141701 Россия

*E-mail: viktoriya.shipunova@phystech.edu

Поступила в редакцию 23.09.2021

Принята к печати 26.01.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11603

РЕФЕРАТ Разработан метод 3D-культивирования клеток с образованием сфероидов для прогнозирования функциональной активности различных соединений *in vivo*. Для формирования и роста объемных клеточных сфероидов использовали агарозный гель, представляющий собой матрицу, состоящую из 9 низкоадгезивных U-образных микроячеек размером 2.3 × 3.3 мм, помещаемую в лунку 12-луночного планшета. Формы для заливки агарозного геля созданы методом 3D-печати. Эффективность метода показана на примере клеточной линии карциномы яичников человека SKOVip-kat со стабильной цитоплазматической экспрессией красного флуоресцентного белка Katushka и сверхэкспрессией мембраноассоциированного онкомаркера HER2. Сфероиды линии SKOVip-kat визуализированы методом флуоресцентной микроскопии. Концентрации клеток оптимизированы для формирования сфероидов с одинаковой формой, размером и плотными межклеточными контактами. Для валидации разработанной модели оценена цитотоксичность адресного анти-HER2 иммунотоксина на основе анти-HER2 каркасного белка DARP 9_29 и фрагмента экзотоксина *Pseudomonas aeruginosa* – DARP-LoPE – на 2D- и 3D-культурах клеток SKOVip-kat. Выявлено различие цитотоксических свойств DARP-LoPE в 2D- и 3D-культуре: значение IC50 в 3D-культуре на порядок выше, чем в монослойной культуре. Описан универсальный метод 3D-культивирования клеток млекопитающих на основе многоцветных форм для заливки агарозного геля, позволяющий воспроизводимо получать мультиклеточные сфероиды с плотными контактами для задач молекулярной и клеточной биологии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА 3D-печать, 3D-клеточные модели, DARPin, TurboFP635.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид; ФИТЦ – флуоресцеин-5(6)-изотиоцианат; DARPin – белок с повторяющимися анкириновыми мотивами; LoPE – низкоиммуногенный участок экзотоксина А грамотрицательных бактерий *Pseudomonas aeruginosa*; HER2 – рецептор 2 эпидермального фактора роста человека.

ВВЕДЕНИЕ

Культивирование клеток млекопитающих в условиях *in vitro* остается одним из самых ценных инструментов молекулярной и клеточной биологии. В 1885 году Вильгельм Ру (Wilhelm Roux) разработал способ культивирования клеток, инкубируя

живые клетки куриного эмбриона в физиологическом растворе в течение нескольких дней, а в 1906 году американский зоолог Росс Гранвилл Харрисон (Ross Granville Harrison) стал первым ученым, который вырастил искусственную культуру ткани [1]. Именно с конца 19 века культуры клеток стали при-

меняться как инструмент для исследования взаимодействия различных веществ с живыми объектами [2]. Двумерные (2D) клеточные модели, являющиеся в настоящее время основным инструментом в экспериментах *in vitro*, находят широкое применение в фундаментальных и прикладных исследованиях, в частности, для разработки методов противоопухолевой терапии с использованием различных гибридных конструкций [3] или наночастиц с загрузкой активных веществ [4–9]. При исследованиях в 2D-культурах учитываются отличия от животных моделей *in vivo*, однако, чтобы спрогнозировать тот или иной эффект в организме, необходимо провести большое число экспериментов на клеточных культурах. К другим недостаткам монослойных культур относится отсутствие тканевой структуры и неограниченный доступ клеток к таким компонентам ростовой среды, как кислород, питательные вещества и метаболиты, в отличие от опухолевой ткани, где доступ этих веществ более вариабелен. Из-за таких ограничений появилась потребность в альтернативной системе, способной имитировать органы и позволяющей проводить рутинные эксперименты в большом количестве без привлечения лабораторных животных. Такими системами стали сферические скопления клеток с межклеточным взаимодействием – трехмерные (3D) модели [10], такие, как плотные скопления клеток, сфероиды, выращиваемые на поверхности низкоадгезивного пластика [11] или агарозы [12], а также полученные с использованием метода «висячих капель» [13], «альгинатных капсул» [14] и других трехмерных систем.

3D-сфероиды опухолевых клеток более приближены к *in vivo* моделям, чем 2D-культуры, которые не отражают архитектуру органов животных, имеющих специфическое строение и пространственную организацию. Сфероиды служат основой для создания органоидов и органов, которые имитируют гетерогенность и патофизиологию онкологических процессов в живом организме, они применяются для тестирования потенциальных лекарственных препаратов [11, 15, 16].

Известно, что опухолевая ткань состоит не только из раковых клеток, но и из стромальных клеток, таких, как фибробласты, эндотелиальные клетки сосудов, перicyты, адипоциты, лимфатические эндотелиальные клетки и клетки иммунной системы. Эти клетки способствуют формированию и росту опухоли, а также участвуют в развитии устойчивости к противоопухолевым препаратам [17]. Сфероиды, состоящие только из опухолевых клеток, формируют взаимодействия клетка–клетка и клетка–внеклеточный матрикс и образуют тем самым барьер для исследуемых веществ [18]. Поэтому резуль-

таты исследований цитотоксических соединений на 3D-моделях отличаются от результатов в монослойных культурах. Таким образом, 3D-культуры наиболее подходят для *in vitro* исследований, направленных на прогнозирование и моделирование реакции опухоли на воздействие лекарственных препаратов. Следовательно, внедрение таких объектов в лабораторную практику сократит затраты и время на выявление новых лекарственных препаратов-кандидатов, а также ускорит процесс клинических испытаний, сократив время до выхода на фармакологический рынок [18, 19].

В данной работе представлен простой и универсальный метод создания 3D-сфероидов – скоплений клеток одинаковой формы и размера – для изучения активности веществ как в фундаментальных, так и в доклинических исследованиях. С помощью 3D-печати получены формы для заливки гелей – молды – из фотополимерной смолы. В молды заливали агарозу, которая служила основой для лунок, где формируются клеточные сфероиды. Методом флуоресцентной микроскопии показано наличие большого количества живых клеток, которые превалируют над мертвыми при росте сфероида. При сравнении 2D- и 3D-клеточных культур выявлены существенные различия в цитотоксичности оригинального адресного иммунотоксина DARP-LoPE [20]. Так, значение IC₅₀ данного иммунотоксина в 3D-культуре примерно на порядок выше, чем в 2D, что необходимо учитывать при подборе доз препарата при инъекции *in vivo* в терапевтических целях.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Условия культивирования клеточных линий

Флуоресцентная клеточная линия карциномы яичников SKOVip-kat получена ранее для исследования действия противоопухолевых соединений на внутрибрюшинную модель метастазирующего рака лабораторных животных с иммунодефицитом [20]. Клетки CHO получены из коллекции лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ РАН. Клеточные линии SKOVip-kat и CHO культивировали в ростовой среде DMEM (Gibco, США) с 10% фетальной бычьей сыворотки (Capricorn, Германия) на культуральных флаконах (Nunc, Дания) в CO₂-инкубаторе (BINDER, Германия) при 37°C и 5% CO₂. С поверхности культуральных флаконов клетки снимали с помощью раствора Версена («ПанЭко», Россия).

Получение сфероидов флуоресцентной клеточной линии SKOVip-kat

Формы для заливки агарозы (молды) получали с использованием 3D-принтера FormLabs Form3

(США). Молды получали с использованием фотополимерной смолы FormLabs Grey Resin 1L (США). В качестве материала для форм, в которых будут формироваться сфероиды, использовали агарозу 1% («ПанЭко»), разведенную в ростовой бесцветной среде Fluorobrite DMEM (Gibco) без добавления фетальной бычьей сыворотки. Сфероиды получали, внося клеточную суспензию SKOVip-kat в лунки агарозного геля в 12-луночной планшете (Nunc) с ростовой средой DMEM (Gibco) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Capricorn), и растили в течение 5 дней в CO₂-инкубаторе (BINDER, Германия) при 37°C и 5% CO₂. Образовавшиеся сфероиды окрашивали флуоресцентными красителями и получали изображения на флуоресцентных микроскопах Leica DMI6000B (Leica Microsystems, Германия) и Axiovert 200 (Carl Zeiss, Германия).

Флуоресцентная микроскопия

Для визуализации изображений использовали флуоресцентные красители Хёхст 33342 («ПанЭко»), пропилий йодид и акридиновый оранжевый (Sigma-Aldrich, США).

Окрашенные сфероиды SKOVip-kat визуализировали с помощью инвертированных флуоресцентных микроскопов Leica DMI6000B и Axiovert 200. Флуоресценцию белка Katushka (TurboFP635) возбуждали ртутной лампой HBO 100W флуоресцентного микроскопа Axiovert 200 с фильтрами возбуждения 565/30 нм и эмиссии 620/60 нм, Хёхст 33342 с фильтрами возбуждения 365/12 нм и эмиссии 397/LP нм, пропилий йодид с фильтрами возбуждения 565/30 нм и эмиссии 620/60 нм. Флуоресценцию белка Katushka возбуждали также металлической галогенидной лампой флуоресцентного микроскопа Leica DMI6000B с фильтрами возбуждения 545/30 нм и эмиссии 610/75 нм, Хёхст 33342 с фильтрами возбуждения 405/10 нм и эмиссии 460/40 нм, пропилий йодид с фильтрами возбуждения 545/30 нм и эмиссии 610/75 нм, акридиновый оранжевый с фильтрами возбуждения 470/40 нм и эмиссии 525/50 нм. Для визуализации 2D-клеточных линий SKOVip-kat и CHO использовали пластиковые 96-луночные планшеты (Nunc). Клетки инкубировали в 100 мкл ростовой бесцветной среды DMEM (Gibco) с фетальной бычьей сывороткой (Capricorn) в течение 12 ч при 37°C и 5% CO₂. Затем вносили моноклональное антитело трастузумаб либо иммунотоксин DARP-LoPE, конъюгированные с флуоресцентным красителем флуоресцеин-5(6)-изотиоцианатом (ФИТЦ), в конечной концентрации 2 мкг/мл [7] и в объеме 100 мкл. Клетки отмывали от несвязавшихся белков и ресуспендировали в 1% растворе бычьего сывороточного альбумина в фос-

фатном буфере. Визуализацию проводили на флуоресцентном микроскопе Leica DMI6000B.

Анализ выживаемости клеточных линий

Цитотоксичность клеточных линий SKOVip-kat [20] и CHO, инкубированных с иммунотоксином DARP-LoPE [21], анализировали с помощью колориметрического МТТ-теста (МТТ – желтый тетразолиевый краситель, который восстанавливается в пурпурный формазан живыми клетками) [22].

Анализ проводили в 96-луночной планшете (Nunc). Клетки SKOVip-kat и CHO (3.5×10^3 клеток на лунку) инкубировали в 100 мкл ростовой бесцветной среды DMEM (Gibco (Thermo Scientific), США) с 10% фетальной бычьей сывороткой (Capricorn) в течение 12 ч при 37°C и 5% CO₂. Далее добавляли 100 мкл иммунотоксина DARP-LoPE и инкубировали в течение 72 ч. После чего среду стряхивали, вносили 100 мкл МТТ в концентрации 0.5 г/л. Через 1 ч стряхивали раствор МТТ, в лунки вносили ДМСО в объеме 100 мкл (Panreac-AppliChem, США) для растворения формазана, после чего измеряли оптическую плотность на спектрофотометре Infinite M100 Pro (Tecan, Австрия) при длине волны $\lambda = 570$ нм и длине волны сравнения 630 нм. Значение концентрации иммунотоксина DARP-LoPE, вызывающее ингибирование роста 50% (IC₅₀) клеток линий SKOVip-kat и CHO, определяли с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 8.0.1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Цель нашей работы состояла в получении воспроизводимых *in vitro* 3D-сфероидов, имитирующих характеристики опухолевых тканей, для тестирования различных активных веществ, в том числе и лекарственных препаратов. Мы использовали линию клеток карциномы яичников человека SKOVip-kat, сверхэкспрессирующую на своей поверхности рецептор HER2 – диагностический и терапевтический маркер некоторых онкологических заболеваний. Эта клеточная линия получена ранее путем стабильной трансфекции клеток линии SKOV3-1ip геном красного флуоресцентного белка Katushka [23]. Возбуждение и эмиссия флуоресценции белка Katushka находятся в ближней инфракрасной области (588 и 635 нм) [24], входящей в «окно прозрачности биоткани», что позволяет с одинаковой эффективностью визуализировать данные клетки как *in vitro*, так и *in vivo*.

Формирование 3D-сфероидов с помощью агарозных форм

При формировании 3D-сфероидов за основу брали агарозу – биоразлагаемый, неадгезивный и нетоксич-

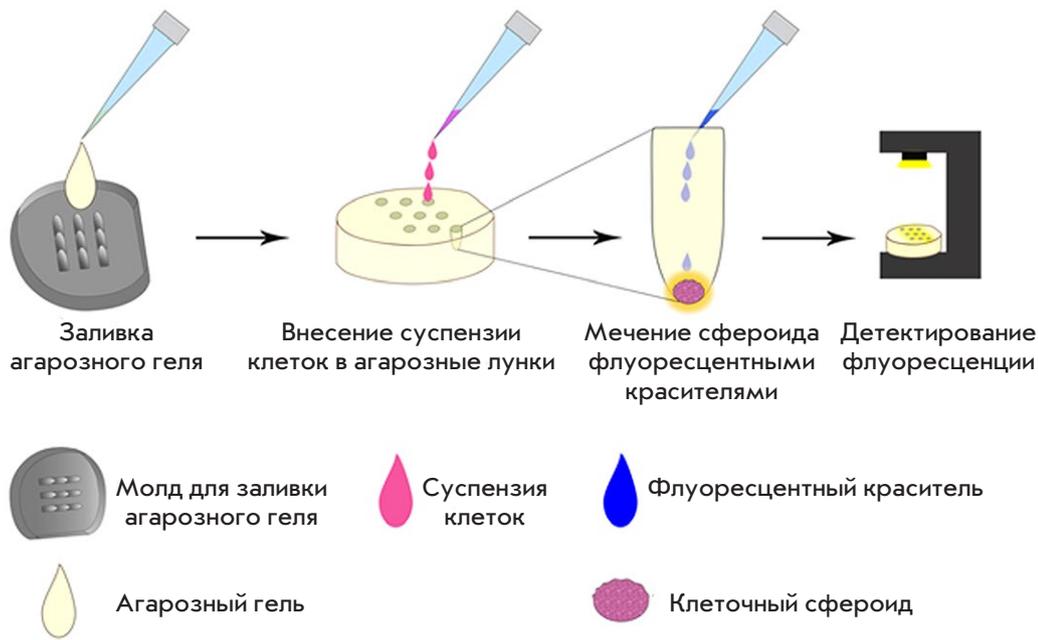


Рис. 1. Схема создания 3D-сфероидов клеток SKOVip-kat. В молды (формы для заливки геля) вносили раствор агарозы и оставляли гель застывать при комнатной температуре. В лунки застывшей формы вносили суспензию клеток SKOVip-kat. После формирования сфероидов клетки метили флуоресцентными красителями и анализировали методом флуоресцентной микроскопии

ный природный полисахарид, полученный из морских водорослей [25]. Агароза обладает характеристиками, необходимыми для создания трехмерных моделей клеточных культур, такими, как большие поры (средний размер 100–300 нм), что позволяет обновлять питательные среды для 3D-роста клеток [25], а также обеспечивать доступ для газов и малых молекул [26]. Агароза является оптически прозрачным материалом, поэтому она удобна для микроскопической визуализации сфероидов. Агарозный гель застывает в молдах при комнатной температуре, что позволяет работать в стерильных условиях без существенных затруднений, при этом формируемые лунки геля доступны для наконечника пипетки, что позволяет вносить клетки или проводить другие манипуляции с формами.

Сформированные агарозные формы образуют 9 одинаковых лунок диаметром 2.3 мм и высотой 3.3 мм, в которых образуются сфероиды одинаковой величины и формы. Созданная форма представляет собой открытую систему, которая позволяет анализировать образование сфероидов и тестировать различные соединения с использованием методов световой и флуоресцентной микроскопии.

На рис. 1 представлена схема создания сфероидов клеточной линии SKOVip-kat. Молды для агарозного геля печатали на 3D-принтере FormLabs Form3 (США) с использованием фотополимерной смолы FormLabs Grey Resin (США). Вмещаемый объем агарозы в молде составил 1200 мкл, объем единичной агарозной лунки – 10 мкл. Поверхность агарозы неадгезивна для клеток, что приводит к самообразованию сфероидов. Сфероиды формировались в те-

чение 5 дней, что подтверждали визуально по наличию межклеточных контактов [26] (рис. 2). На рис. 2 представлены результаты оценки жизнеспособности клеток внутри сфероидов с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DMI6000B. Для визуализации проводили съемку по оси Z с шагом 200 нм трех репрезентативных сфероидов, окрашенных флуоресцентными красителями. Флуоресцентный краситель акридиновый оранжевый окрашивает нуклеиновые кислоты живых клеток; пропидий йодид – нуклеиновые кислоты [27] мертвых клеток, так как мембраны живых клеток непроницаемы для красителя; Хёхст 33342 окрашивает нуклеиновые кислоты в ядрах [28] за счет прохождения через мембраны живых клеток [29]. Окрашивание акридиновым оранжевым и Хёхст 33342 показало, что живых клеток как внутри, так и снаружи сфероидов больше, чем мертвых, окрашенных пропидий йодидом. Таким образом, полученные нами 3D-культуры клеток наиболее подходят для тестирования лекарственных препаратов, так как клетки в сфероиде создают межклеточные контакты и формируют приближенную модель раковых тканей, т.е. они представляют собой более адекватную *in vitro* систему в сравнении с 2D-культурами.

Оценка экспрессии рецептора HER2 на поверхности клеток SKOVip-kat

Рецептор HER2 (рецептор эпидермального фактора роста человека типа 2) – широко известный мембраноассоциированный онкомаркер [30–32]. Чаще всего этот рецептор сверхэкспрессируется при раке молочной железы, яичников, эндометрия, желуд-

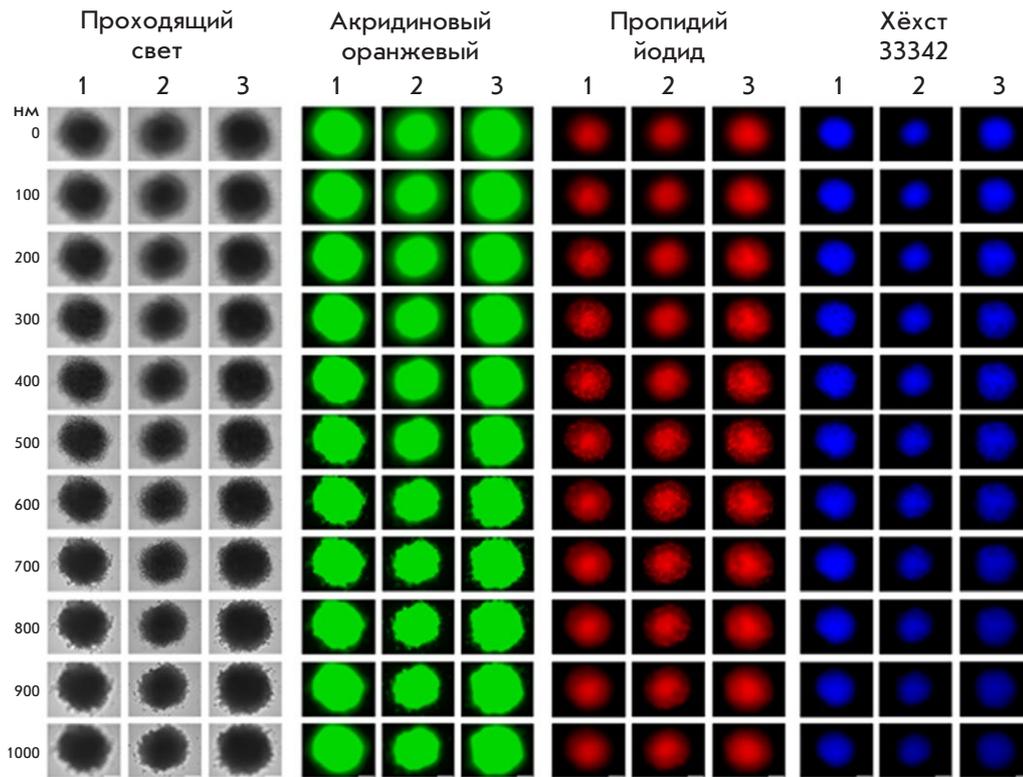


Рис. 2. Визуализация сфероидов SKOVip-kat. Визуализация трех сфероидов с шагом 200 нм по оси Z, окрашенных флуоресцентными красителями: акридиновым оранжевым, Хёхст 33342 и пропидий йодидом. Фильтры возбуждения и эмиссии для детекции акридинового оранжевого – 470/40 и 525/50 нм; пропидия йодида – 545/30 и 610/75 нм; Хёхст 33342 – 405/10 и 460/40 нм. Масштабная линейка 250 мкм

ка и пищевода, при этом в нормальных клетках его экспрессия находится на низком уровне [33]. Например, этот онкомаркер находят в 30% случаев рака молочной железы [34], поэтому HER2 считается важной мишенью в диагностике и терапии опухолей. Экспрессию рецептора HER2 на поверхности клеток SKOVip-kat оценивали с использованием моноклонального антитела трастузумаб, конъюгированного с флуоресцентным красителем ФИТЦ. В качестве отрицательного контроля использовали клеточную линию CHO яичников китайского хомяка, на поверхности клеток которой отсутствует рецептор HER2 (рис. 3). Обе клеточные линии инкубировали с конъюгатом трастузумаб-ФИТЦ, а затем визуализировали на флуоресцентном микроскопе Leica DMI6000B. Данные, представленные на рис. 3, подтверждают присутствие рецептора HER2 на поверхности клеток SKOVip-kat.

Цитотоксичность иммунотоксина DARP-LoPE в 2D-культуре

Для валидации разработанной 3D-модели как средства изучения противоопухолевой эффективности соединений оценили цитотоксичность адресного противоопухолевого соединения – иммунотоксина DARP-LoPE.

Имунотоксины – адресные белки, соединенные с токсином, выделенным из бактерий или ядови-

тых растений [35, 36], рассматриваются как одни из наиболее перспективных адресных молекул для онкотерапии. Иммунотоксин DARP-LoPE был сконструирован ранее генно-инженерным методом с использованием неиммуноглобулинового белка с анкириновыми повторами (Designed Ankyrin Repeat Proteins) DARP 9_29, который связывается с рецептором HER2 [37, 38], и низкоиммуногенного варианта участка экзотоксина A (LoPE), выделенного из грамотрицательных бактерий *Pseudomonas aeruginosa* [21]. Этот иммунотоксин специфично связывается с рецептором HER2 и вызывает гибель раковых клеток *in vitro* [21]. Более того, DARP-LoPE эффективно подавляет рост HER2-положительных ксенотрансплантатов карциномы яичников человека, что подтверждает эффективность адресных препаратов на основе дарпинов [5, 20, 21, 39].

На рис. 4 представлены результаты анализа цитотоксичности иммунотоксина DARP-LoPE и данные флуоресцентной микроскопии, подтверждающие специфичность связывания иммунотоксина с клетками SKOVip-kat. Цитотоксичность оценивали с помощью МТТ-теста и обрабатывали данные с использованием программного обеспечения OriginPro 2015. Полученные результаты указывают на адресную цитотоксичность иммунотоксина DARP-LoPE для клеточной линии SKOVip-kat и отсутствие цитотоксичности для CHO. Значение IC50 для имму-

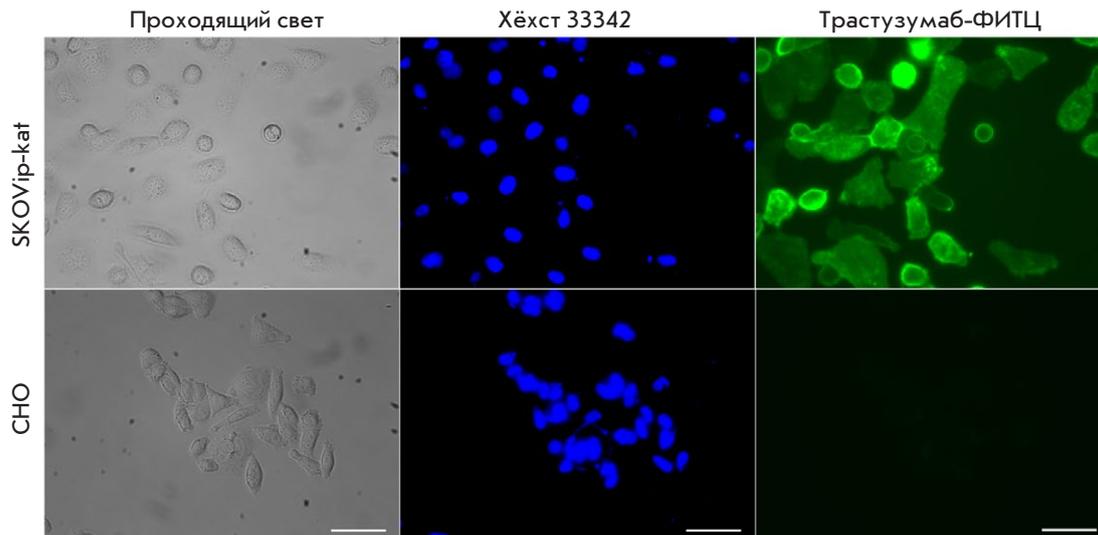


Рис. 3. Визуализация экспрессии рецептора HER2 на клеточных линиях SKOVip-kat (HER2-положительные) и CHO (HER2-отрицательные) моноклональным антителом трастузумаб, конъюгированным с флуоресцентным красителем ФИТЦ. Экспрессия HER2 на поверхности клеток SKOVip-kat подтверждается интенсивным окрашиванием мембраны клеток анти-HER2-антителом. Ядра клеток окрашены Хёхст 33342. Фильтры возбуждения и эмиссии для детекции флуоресцентных красителей Хёхст 33342 – 405/10 и 460/40 нм, ФИТЦ – 470/40 и 525/50 нм. Масштабная линейка 50 мкм

нотоксина DARP-LoPE на клеточной линии SKOVip-kat составило 41.9 нМ (рис. 4А).

Визуализация опухолевых клеток с помощью меченя рецептора HER2 на поверхности клеточной линии SKOVip-kat моноклональным антителом трастузумаб и иммунотоксином DARP-LoPE, конъюгированным с ФИТЦ. Показано, что иммунотоксин эффективно взаимодействует с рецептором HER2 на поверхности опухолевых клеток, как и трастузумаб (рис. 4Б).

Исследование цитотоксичности иммунотоксина DARP-LoPE в сфероиде SKOVip-kat

Для выбора оптимальных количеств клеток в лунках сфероидов тестировали диапазон концентраций от 1500 до 15000 клеток на лунку. Оптимальные концентрации определяли на 3-й день инкубации клеток в агарозных лунках по результатам микроскопии в проходящем свете и флуоресцентной визуализации белка Katushka в SKOVip-kat. Воспроизводимость результатов и формирование клеточных контактов (отсутствие разрозненности клеток) [26] наблюдали в лунках с 15000 клеток в сфероиде (рис. 5).

Вместе с подбором концентраций клеток изучали цитотоксичность иммунотоксина DARP-LoPE, инкубируя сфероиды с DARP-LoPE в различных концентрациях. После инкубации с белком и окрашивания Хёхст 33342 и пропидий йодидом образцы анализировали методом флуоресцентной микроскопии

(рис. 5). Визуально определили IC₅₀ иммунотоксина DARP-LoPE в 3D-культуре – 0.3 нМ, что примерно в 8 раз больше, чем IC₅₀ в 2D-культуре – 41.9 нМ. Поскольку по структурной организации 3D-модели клеток более приближены к *in vivo* моделям животных, чем 2D, то результаты визуализации и определения цитотоксичности в трехмерной культуре, по-видимому, будут сопоставимыми с результатами, полученными на животных объектах *in vivo*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Переход от 2D- к 3D-моделям необходим из-за недостаточной информативности двумерных систем при исследовании различных эффектов или тестировании препаратов для диагностики и лечения различных заболеваний. Создание трехмерных сфероидов, имитирующих солидные опухоли, и внедрение их в исследовательскую практику необходимо и по этическим соображениям – результаты, полученные на таких системах, более приближены к результатам *in vivo* [40]. Таким образом, применение этих моделей, возможно, сократит количество экспериментов на животных, необходимых для скрининга лекарственных препаратов [41].

3D-сфероиды клеток образуют особую среду с отличающимися от двумерных структур характеристиками – значением pH, наличием и концентрацией аутокринных факторов, концентрацией кислорода и CO₂; при этом клетки в таком микроокружении обладают своей морфологией, способно-

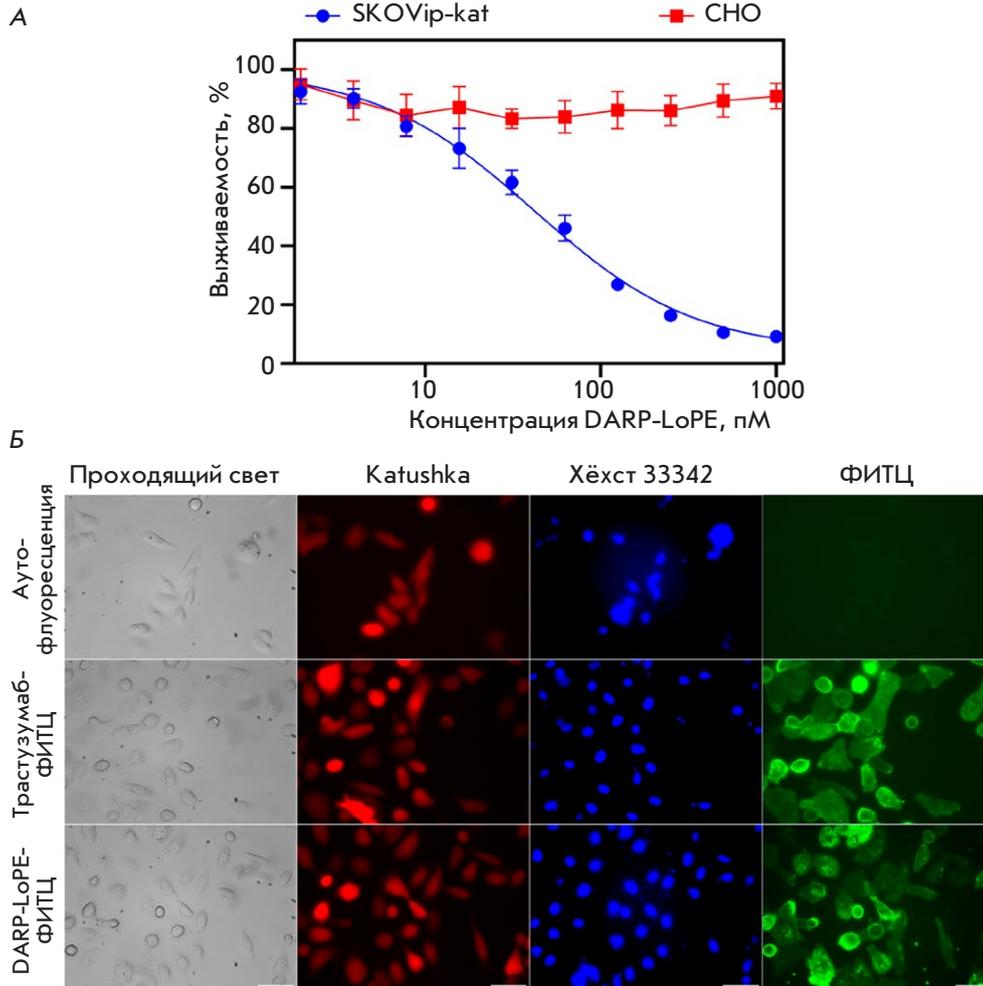


Рис. 4. Исследование взаимодействия адресного иммунотоксина DARP-LoPE с клетками SKOVip-kat. **А** – определение цитотоксичности DARP-LoPE по отношению к клеточным линиям SKOVip-kat и CHO методом МТТ-теста. За 100% принимали выживаемость клеток без взаимодействия с иммунотоксином DARP-LoPE. **Б** – визуализация живых клеток с помощью белка Katushka (TurboFP635) и красителя Хёхст 33342; визуализация экспрессии рецептора HER2 на клетках SKOVip-kat, инкубированных с моноклональным антителом трастузумаб-ФИТЦ и иммунотоксином DARP-LoPE-ФИТЦ. Фильтры возбуждения и эмиссии для детекции белка Katushka – 545/30 и 610/75 нм; флуоресцентных красителей: Хёхст 33342 – 405/10 и 460/40 нм и ФИТЦ – 470/40 и 525/50 нм. Масштабная линейка 50 мкм

стью к дифференцировке и пролиферации, а также реакцией на различные стимулы, тем самым имитируя поведение *in vivo*. Эти свойства клеток в сфероиде важны для исследования действия различных препаратов, так как созданная микросреда ограничивает их проникновение, поэтому для достижения желаемого эффекта требуется увеличенная концентрация вещества [18].

В нашей работе представлен метод создания сфероидов раковых клеток, основанный на 3D-печати молдов из фотополимерной смолы и их заливки агарозой. Это простой и воспроизводимый метод тестирования лекарственных препаратов, результаты определения цитотоксичности с его использованием будут более приближены к результатам *in vivo*. 3D-печать на сегодняшний день становится доступным методом получения форм с заданными характеристиками, который широко используется в разных областях, таких, как регенеративная медицина [42], инженерия [43], архитектура [44] и производство [45]. В настоящее время 3D-принтеры и материалы для создания желаемых объектов стали доступны-

ми по цене [46], что позволит использовать данную методику во многих лабораториях. Использование агарозы как основы для образования сфероидов делает этот метод максимально эффективным для рутинных экспериментов. Поскольку агароза низкоадгезивна для клеток, то взаимодействия возникают только между клетками, что способствует росту клеток по всем направлениям, а не только в плоскости. Помимо этого, агароза – это прозрачный полимер, поэтому ее можно использовать в различных исследованиях, в частности, в фотодинамической терапии. Более того, разработанная модель сфероидов представляет собой открытую систему, в которой можно проводить такие манипуляции с клетками, как замена среды и отмывка от различных компонентов, внешние воздействия электромагнитным излучением, внесение клеток других типов (эндотелий, фибробласты), а также помещение образцов биоптата в единичную лунку.

На примере флуоресцентной клеточной линии SKOVip-kat с помощью разработанной методики получены воспроизводимые 3D-сфероиды одинаковой

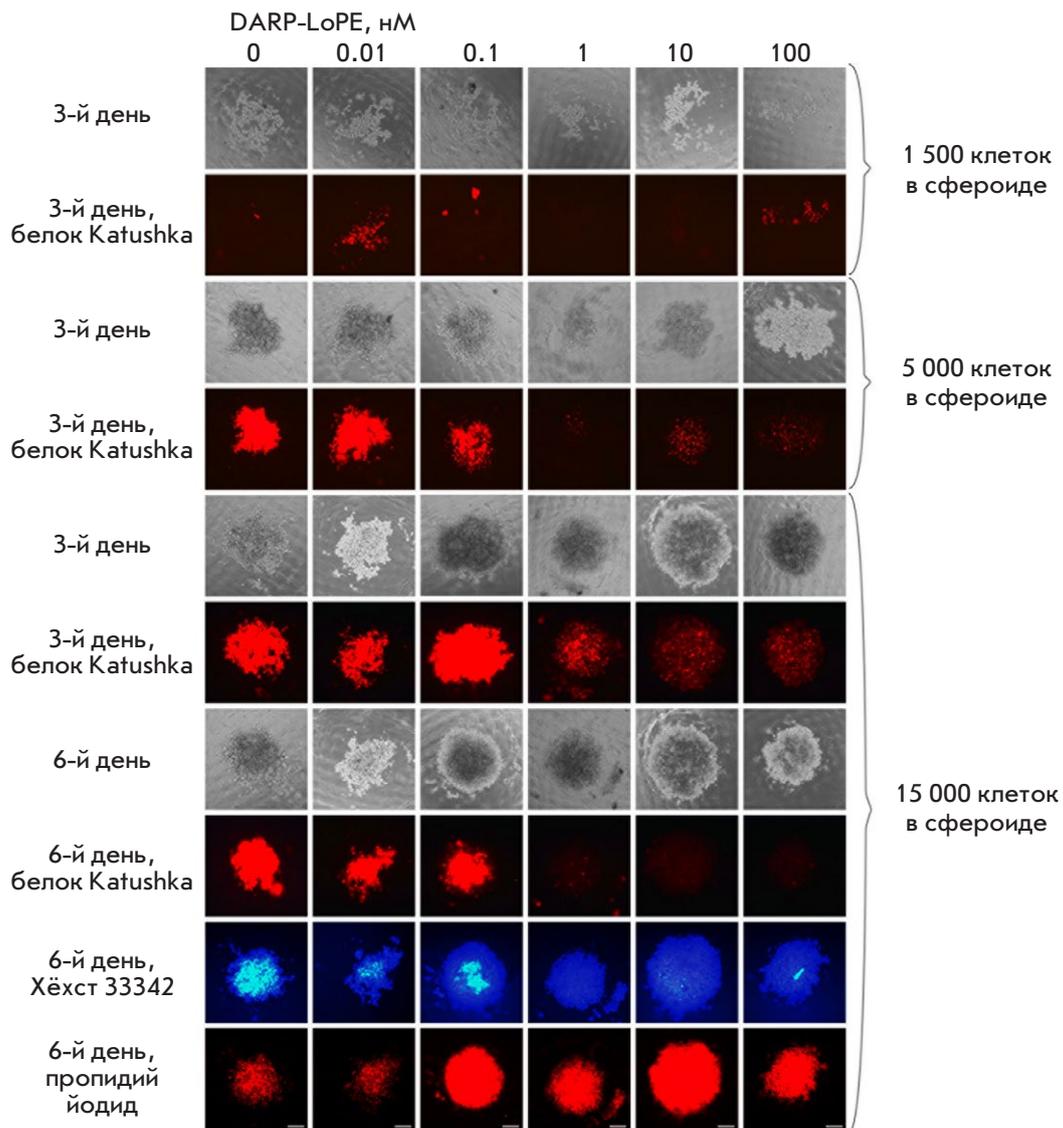


Рис. 5. Визуализация сфероидов SKOVip-kat и определение цитотоксичности иммунотоксина DARP-LoPE в 3D-культуре. Клетки инкубировали с различными концентрациями иммунотоксина и анализировали их жизнеспособность в течение 6 дней. Определяли цитотоксичность иммунотоксина DARP-LoPE по отношению к клеткам SKOVip-kat в 3D-культуре, при этом сфероиды формировали с разным количеством клеток SKOVip-kat. Показано, что для создания 3D-культуры оптимальным является 15000 клеток в сфероиде. Жизнеспособность клеток SKOVip-kat оценивали по флуоресценции белка Katushka с использованием флуоресцентной микроскопии в режиме реального времени на 3-й и 6-й день, при этом на 6-й день, инкубируя сфероиды с красителями. С помощью Хёхст 33342 визуализировали живые клетки, с помощью пропидия йодида – мертвые. Фильтры возбуждения и эмиссии для детекции Katushka – 565/30 и 620/60 нм; Хёхст 33342 – 365/12 и 397/LP нм и пропидия йодида – 565/30 и 620/60 нм. Масштабная линейка 250 мкм

формы и размера. С использованием колориметрического теста и флуоресцентной микроскопии выявили значительные различия в действии адресного иммунотоксина на 2D- и 3D-модели. Таким образом, нами разработан простой и эффективный метод получения репрезентативных 3D-моделей сфероидов для молекулярно-биологических и клеточных исследований [47, 48]. ●

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ № 19-29-04012 мк (разработка 3D-модели ErbB2-положительных опухолей) и РНФ № 17-74-20146 (выделение и очистка адресного иммунотоксина, определение цитотоксичности).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Harrison R.G. // *Exp. Biol. Med.* 1906. V. 4. № 1. P. 140–143.
2. Yao T., Asayama Y. // *Reprod. Med. Biol.* 2017. V. 16. № 2. P. 99–117.
3. Grebenik E.A., Kostyuk A.B., Deyev S.M. // *Russ. Chem. Rev.* 2016. V. 85. № 12. P. 1277–1296.
4. Shipunova V.O., Sogomonyan A.S., Zelepukin I.V., Nikitin M.P., Deyev S.M. // *Molecules.* 2021. V. 26. № 13. P. 3955. doi: 10.3390/molecules26133955.
5. Shramova E., Proshkina G., Shipunova V., Ryabova A., Kamyshinsky R., Konevega A., Schulga A., Konovalova E., Telegin G., Deyev S. // *Cancers (Basel).* 2020. V. 12. № 10. P. 3014. doi: 10.3390/cancers12103014.
6. Shipunova V.O., Komedchikova E.N., Kotelnikova P.A., Zelepukin I.V., Schulga A.A., Proshkina G.M., Shramova E.I., Kutscher H.L., Telegin G.B., Kabashin A.V., et al. // *ACS Nano.* 2020. V. 14. № 10. P. 12781–12795.
7. Shipunova V.O., Kolesnikova O.A., Kotelnikova P.A., Soloviev V.D., Popov A.A., Proshkina G.M., Nikitin M.P., Deyev S.M. // *ACS Omega.* 2021. V. 6. № 24. P. 16000–16008.
8. Zelepukin I.V., Popov A.A., Shipunova V.O., Tikhonowski G.V., Mirkasymov A.B., Popova-Kuznetsova E.A., Klimentov S.M., Kabashin A.V., Deyev S.M. // *Mater. Sci. Eng. C.* 2021. V. 120. P. 111717.
9. Kabashin A.V., Kravets V.G., Wu F., Imaizumi S., Shipunova V.O., Deyev S.M., Grigorenko A.N. // *Adv. Funct. Mater.* 2019. V. 29. № 26. P. 1902692.
10. Kapaczyńska M., Kolenda T., Przybyła W., Zajączkowska M., Teresiak A., Filas V., Ibbs M., Bliźniak R., Łuczewski Ł., Lamperska K. // *Arch. Med. Sci.* 2016. V. 14. № 4. P. 910–919.
11. Zononi M., Piccinini F., Arienti C., Zamagni A., Santi S., Polico R., Bevilacqua A., Tesesi A. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 19103.
12. Liao W., Wang J., Xu J., You F., Pan M., Xu X., Weng J., Han X., Li S., Li Y., et al. // *J. Tissue Eng.* 2019. V. 10. P. 2041731419889184. doi: 10.1177/2041731419889184.
13. Białkowska K., Komorowski P., Bryszewska M., Miłowska K. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 17. P. 6225. doi: 10.3390/ijms21176225.
14. Andersen T., Auk-Emblem P., Dornish M. // *Microarrays.* 2015. V. 4. № 2. P. 133–161.
15. Zhang C., Yang Z., Dong D.-L., Jang T.-S., Knowles J.C., Kim H.-W., Jin G.-Z., Xuan Y. // *J. Tissue Eng.* 2020. V. 11. P. 1–17.
16. Balalaeva I.V., Sokolova E.A., Puzhikhina A.D., Brilkina A.A., Deyev S.M. // *Acta Naturae.* 2017. V. 9. № 1. P. 38–44.
17. Zononi M., Cortesi M., Zamagni A., Arienti C., Pignatta S., Tesesi A. // *J. Hematol. Oncol.* 2020. V. 13. № 1. P. 97.
18. Sant S., Johnston P.A. // *Drug Discov. Today Technol.* 2017. V. 23. P. 27–36.
19. Godugu C., Patel A.R., Desai U., Andey T., Sams A., Singh M. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 1. P. e53708.
20. Sokolova E.A., Shilova O.N., Kiseleva D.V., Schulga A.A., Balalaeva I.V., Deyev S.M. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 10. P. 2399. doi: 10.3390/ijms20102399.
21. Proshkina G.M., Kiseleva D.V., Shilova O.N., Ryabova A.V., Shramova E.I., Stremovskiy O.A., Deyev S.M. // *Mol. Biol.* 2017. V. 51. № 6. P. 865–873.
22. Mosmann T. // *J. Immunol. Methods.* 1983. V. 65. № 1–2. P. 55–63.
23. Zdobnova T., Sokolova E., Stremovskiy O., Karpenko D., Telford W., Turchin I., Balalaeva I., Deyev S. // *Oncotarget.* 2015. V. 6. № 31. P. 30919–30928.
24. Shcherbo D., Merzlyak E.M., Chepurnykh T.V., Fradkov A.F., Ermakova G.V., Solovieva E.A., Lukyanov K.A., Bogdanova E.A., Zارايسky A.G., Lukyanov S., et al. // *Nat. Methods.* 2007. V. 4. № 9. P. 741–746.
25. Shin S., Ikram M., Subhan F., Kang H.Y., Lim Y., Lee R., Jin S., Jeong Y.H., Kwak J.-Y., Na Y.-J., et al. // *RSC Adv.* 2016. V. 6. № 52. P. 46952–46965.
26. Tang Y., Liu J., Chen Y. // *Microelectron. Eng.* 2016. V. 158. P. 41–45.
27. Nicoletti I., Migliorati G., Pagliacci M.C., Grignani F., Riccardi C. // *J. Immunol. Methods.* 1991. V. 139. № 2. P. 271–279.
28. Arndt-Jovin D.J., Jovin T.M. // *J. Histochem. Cytochem.* 1977. V. 25. № 7. P. 585–589.
29. Purschke M., Rubio N., Held K.D., Redmond R.W. // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2010. V. 9. № 12. P. 1634–1639.
30. Krishnamurti U., Silverman J.F. // *Adv. Anat. Pathol.* 2014. V. 21. № 2. P. 100–107.
31. Carlsson J., Nordgren H., Sjöström J., Wester K., Villman K., Bengtsson N.O., Ostenstad B., Lundqvist H., Blomqvist C. // *Br. J. Cancer.* 2004. V. 90. № 12. P. 2344–2348.
32. Murphy C.G., Modi S. // *Biologics.* 2009. V. 3. P. 289–301.
33. Iqbal N., Iqbal N. // *Mol. Biol. Int.* 2014. V. 2014. P. 852748.
34. Mitri Z., Constantine T., O'Regan R. // *Chemother. Res. Pract.* 2012. V. 2012. P. 743193.
35. Stepanov A.V., Belogurov A.A., Ponomarenko N.A., Stremovskiy O.A., Kozlov L.V., Bichucher A.M., Dmitriev S.E., Smirnov I.V., Shamborant O.G., Balabashin D.S., et al. // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 6. P. e20991.
36. Pastan I., Hassan R., FitzGerald D.J., Kreitman R.J. // *Annu. Rev. Med.* 2007. V. 58. P. 221–237.
37. Boersma Y.L., Plückthun A. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2011. V. 22. № 6. P. 849–857.
38. Dreier B., Honegger A., Hess C., Nagy-Davidescu G., Mittl P.R.E., Grütter M.G., Belousova N., Mikheeva G., Krasnykh V., Plückthun A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. V. 110. № 10. P. E869–877.
39. Plückthun A. // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2015. V. 55. P. 489–511.
40. de Dios-Figueroa G.T., Aguilera-Marquez J.D.R., Camacho-Villegas T.A., Lugo-Fabres P.H. // *Biomedicines.* 2021. V. 9. № 6. P. 602. doi: 10.3390/biomedicines9060602.
41. Jensen C., Teng Y. // *Front. Mol. Biosci.* 2020. V. 7. P. 33.
42. Nakayama Y., Takewa Y., Sumikura H., Yamanami M., Matsui Y., Oie T., Kishimoto Y., Arakawa M., Ohmura K., Tajikawa T., et al. // *J. Biomed. Mater. Res. B.* 2015. V. 103. № 1. P. 1–11.
43. Kun K. // *Procedia Eng.* 2016. V. 149. № 2. P. 203–211.
44. Nicholas P., Rossi G., Williams E., Bennett M., Schork T. // *Int. J. Archit. Comput.* 2020. V. 18. № 4. P. 371–384.
45. Murphy S.V., Atala A. // *Nat. Biotechnol.* 2014. V. 32. № 8. P. 773–785.
46. Wang L., Pumera M. // *Trends Analyt. Chem.* 2021. V. 135. P. 116151.
47. Tolmachev V.M., Chernov V.I., Deyev S.M. // *Russ. Chem. Rev.* 2022. V. 91. RCR5034. <https://doi.org/10.1070/RCR5034>
48. Shipunova V.O., Deyev S.M. // *Acta Naturae.* 2022. V. 14. № 1(52). P. 54–72.

УДК 616-079.3

Анализ уровней TREC и KREC в образцах сухой крови новорожденных разного гестационного возраста и веса

Д. А. Черемохин^{1,2*}, Х. Шинвари³, С. С. Дерябина^{1,2,3}, М. А. Болков^{1,3}, И. А. Тузанкина^{1,3},
Д. А. Кудлай^{4,5}

¹Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, 620049 Россия

²Клинико-диагностический центр «Охрана здоровья матери и ребенка», Екатеринбург, 620041 Россия

³Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, 620083 Россия

⁴Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, 119991 Россия

⁵ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва, 115522 Россия

*E-mail: dimacheremokhin@gmail.com

Поступила в редакцию 04.07.2021

Принята к печати 12.01.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11501

РЕФЕРАТ Врожденные ошибки иммунитета можно выявлять, определяя кольцевые молекулы ДНК, образующиеся в ходе реаранжировки T- и B-клеточных рецепторов (TREC и KREC). Известно, что созревание и активация иммунной системы плода происходят постепенно в соответствии со сроками гестации, что указывает на важность определения параметров иммунитета у недоношенных детей в разные периоды развития. Представлены результаты определения числа копий TREC и KREC с помощью ПЦР в реальном времени у детей разного гестационного возраста с учетом веса и пола новорожденного. Определены 95% интервалы уровней TREC и KREC (выраженные в числе копий на 10^5 клеток) в различных возрастных группах. Обнаружено, что количество маркеров наивных лимфоцитов зависит от гестационной стадии развития в ранний неонатальный период.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА TREC, KREC, первичный иммунодефицит, врожденные ошибки иммунитета, тяжелая комбинированная иммунная недостаточность.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ВОИ – врожденные ошибки иммунитета; ПИД – первичный иммунодефицит; ТКИН – тяжелая комбинированная иммунная недостаточность.

ВВЕДЕНИЕ

Врожденные ошибки иммунитета (ВОИ), известные как первичные иммунодефициты, представляют собой группу генетически детерминированных заболеваний, которые проявляются в разнообразных дефектах развития или функции иммунной системы. В 2019 году Международным союзом иммунологических обществ (IUIS) классифицировано и перечислено более 450 отдельных нозологических ВОИ [1]. Благодаря успехам в понимании патогенетических основ и совершенствованию методов лабораторной диагностики удалось поставить клинический диагноз большому числу пациентов, подтвержденный результатами молекулярно-гене-

тических исследований. Распространенность ВОИ в настоящее время составляет 1.27 на 10 000 случаев [2, 3].

V(D)J-рекомбинация – одно из важнейших событий адекватно реагирующей иммунной системы, в процессе которой происходит образование разнообразных и функциональных репертуаров T- и B-клеточных рецепторов (TCR и BCR соответственно), а также антител. Эти процессы – важные этапы становления адаптивного иммунитета [4], в которых важную роль играют рекомбиназы RAG1 и RAG2, катализирующие процесс реаранжировки фрагментов ДНК генов T-клеточного рецептора при созревании T-клеток и в ходе развития

В-клеточного ответа на этапе подбора вариабельных цепей иммуноглобулинов [5].

Экцизионные рекомбинантные кольца Т-клеточного рецептора (T-cell Receptor Excision Circle, TREC) представляют собой кольцевые фрагменты ДНК, образующиеся при перестройке гена *TCR* в тимоцитах. TREC транспортируются в виде эписомальной ДНК из ядра в цитоплазму уже самостоятельных, хотя еще наивных Т-клеток, где они и остаются, не включаясь в процессы репликации во время митоза. В результате концентрация молекул TREC отражает содержание именно наивных Т-лимфоцитов, что, безусловно, является важным диагностическим критерием [6–8]. Во время реаранжировки гена *BCR* в наивных В-клетках образуются сходные с TREC дунитевые кольцевые ДНК – фрагменты рекомбинации генов каппа-цепей иммуноглобулинов (Kappa-deleting Recombination Excision Circle – KREC) [9]. KREC, образующийся в процессе реаранжировки интрона *RSS-K* в локусе *IGK*, используется для оценки неогенеза В-клеток из костного мозга [10, 11]. И TREC, и KREC нерепликативны и стабильны, их количество не изменяется во время пролиферации клеток, например, в процессе клональной экспансии [12, 13]. Как результат, определение количества молекул TREC и KREC широко используется для оценки состояния тимуса и костного мозга в различных физиологических и патологических состояниях. Значения уровней TREC и KREC в крови может служить критерием высокой диагностической значимости при различных иммунодефицитных состояниях. Разработан метод мультиплексной количественной ПЦР в реальном времени, позволяющий обнаруживать дефекты генерации Т- и В-клеток путем одновременного измерения количества копий TREC и KREC [14, 15]. Проведение массового скрининга на содержание TREC/KREC поможет отнести ребенка к группе риска по иммунологическому профилю уже в период новорожденности, что обеспечит повышение выживаемости детей с иммунозависимой патологией и снижение материальных затрат [16–18]. Этот анализ имеет и другие преимущества, включая высокую чувствительность, высокую пропускную способность, относительно низкую цену и возможность использования ДНК, выделенной из минимального объема образцов крови, собранных на Гатри-картах [6, 16, 19]. Это позволяет использовать молекулы TREC и KREC в качестве маркеров функциональности тимуса и костного мозга в различных клинических условиях, в частности, при врожденных ошибках иммунитета. Однако, чтобы говорить о характеристике пациентов с ВОИ, необходимо знать состояние данных маркеров им-

мунитета у здоровых индивидов, учитывая, в частности, половозрастные особенности каждого [20]. В настоящее время актуальным остается определение количественного содержания TREC и KREC в крови новорожденных.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Образцы сухой крови

В исследование было включено 80 образцов сухой крови, полученных от условно здоровых (отсутствие отклонений по результатам массового неонатального скрининга и факта переливания крови) детей (40 мальчиков и 40 девочек), собранных на фильтры Perkin Elmer 226 Guthrie cards (Perkin Elmer Health Sciences, США). Гатри-карты до использования хранились при комнатной температуре в лаборатории неонатального скрининга ГАУЗ СО Клинико-диагностический центр «Охрана здоровья матери и ребенка» (Екатеринбург).

Выделение ДНК

ДНК выделяли методом магнитной сорбции с помощью набора Magna Pure LC DNA Isolation Kit I из семи дисков сухой крови диаметром 3.2 мм (~20 мкл) на автоматической станции выделения нуклеиновых кислот Magna Pure LC 2.0 Instrument по стандартному протоколу DNA I Blood_Cells_High_Performance. Этап предварительной обработки образцов сухой крови включал лизис образцов вне прибора с использованием буфера, входящего в состав набора Magna Pure LC DNA Isolation Kit II (Tissue): к образцам сухой крови добавляли 260 мкл лизирующего буфера и 40 мкл протеиназы K, тщательно вортиксовали и инкубировали при 65°C в течение 20 мин, периодически перемешивая содержимое пробирок, после чего инкубировали при 95°C в течение 10 мин (встряхивали на вортексе каждые 5 мин), охлаждали образцы до комнатной температуры, экстракт переносили в «картридж для внесения образцов» и загружали на борт станции.

ПЦР-анализ TREC и KREC

Количественное определение молекул TREC и KREC основано на использовании метода ПЦР в режиме регистрации флуоресцентного сигнала в реальном времени. Исследование проводили с помощью набора реагентов «Иммуно-БиТ» (АБВ-тест, Россия) на приборе CFX96 (Bio-Rad, США) согласно инструкции производителя. Рассчитывали количество молекул TREC и KREC в 10^5 ядросодержащих клеток (лейкоцитов) относительно количества копий гена *ALB* по формуле:



Рис. 1. Распределение группы условно здоровых детей по гестационному возрасту и весу при рождении

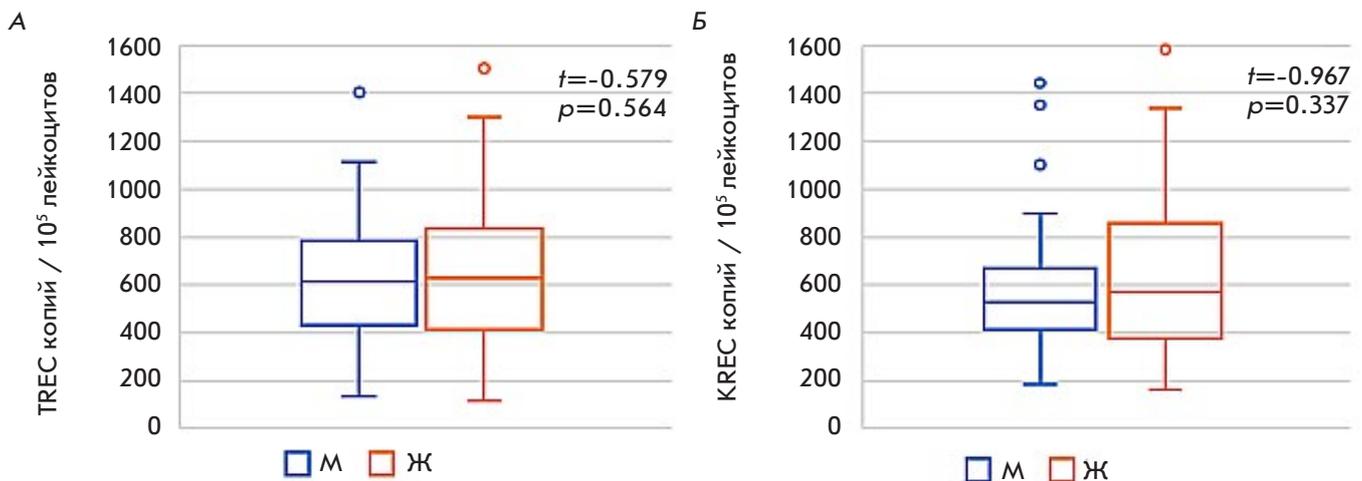


Рис. 2. Количество TREC (А) и KREC (Б) в группе условно здоровых девочек (Ж) и мальчиков (М). Примечание: здесь и далее – на диаграмме отображены: медиана, межквартильный (25-й и 75-й процентиля) и максимальный размах (минимум, максимум) переменной

$$TREC(KREC) \text{ копий} / (10^5 \text{ лейкоцитов}) = \frac{TREC(KREC) \frac{\text{копий}}{\text{мл}}}{ALB \frac{\text{копий}}{\text{мл}}} \times 200000.$$

Если количество копий гена *ALB* было меньше 10^5 копий/мл, то результат считали невалидным, исследование повторяли, начиная с этапа выделения ДНК.

Статистические методы

Математическую обработку данных проводили с использованием пакетов статистических программ Microsoft Excel (Microsoft Office 365, США) и IBM SPSS Statistics, version 21 (IBM Corp., США).

Нормальность распределения данных оценивали с использованием теста Шапиро–Уилка, для описательных характеристик использовали среднее арифметическое и стандартную ошибку среднего ($m \pm SE$). В ходе анализа статистической значимости различий средних значений и наличия корреляционных взаимосвязей использовали Т-критерий Стьюдента для независимых выборок и коэффициент корреляции Пирсона (r) соответственно. Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В исследование вошли 80 условно здоровых детей (40 мальчиков и 40 девочек), рожденных в Свердловской области в 2020 году на разных сроках гестации (рис. 1).

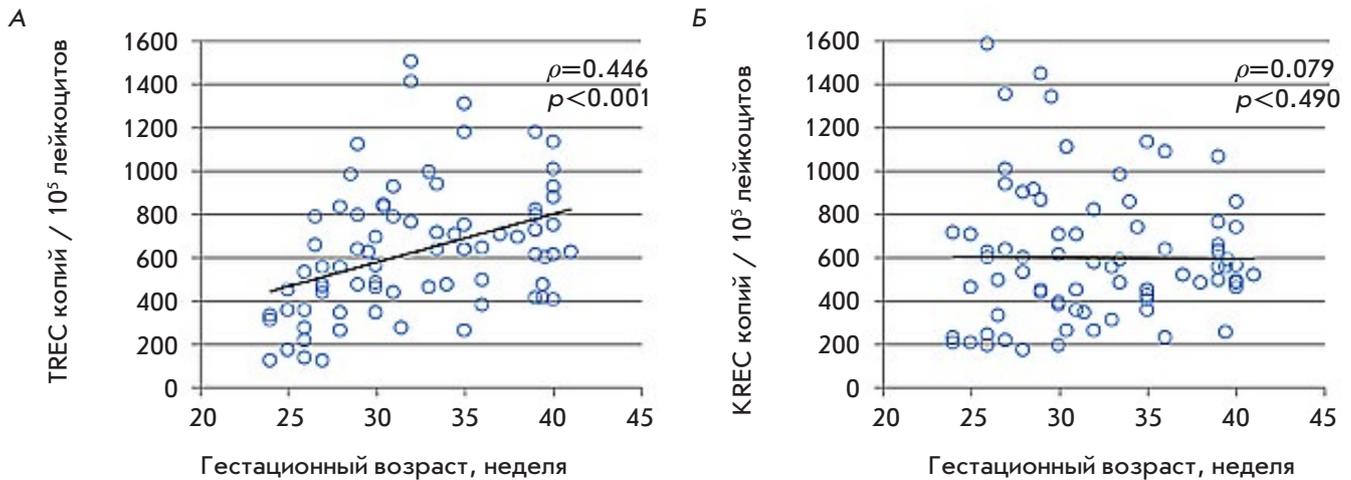


Рис. 3. Количество молекул TREC (А) и KREC (Б) в образцах сухой крови условно здоровых детей в зависимости от гестационного возраста в раннем неонатальном периоде

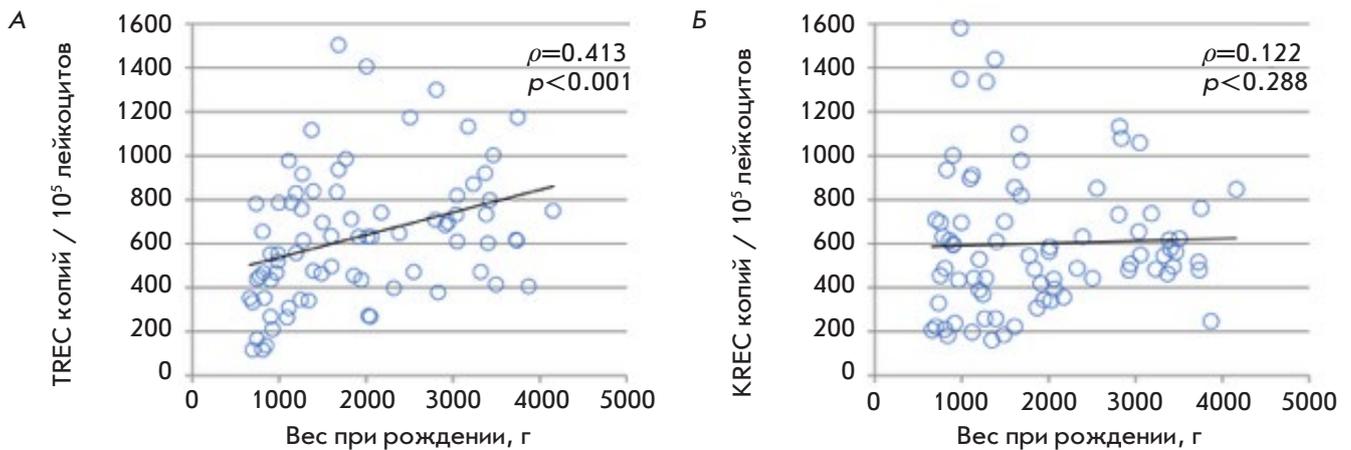


Рис. 4. Количество молекул TREC (А) и KREC (Б) в образцах сухой крови условно здоровых детей в зависимости от веса при рождении

Гендерные различия в содержании TREC и KREC

Анализ содержания молекул TREC и KREC в образцах сухой крови условно здоровых мальчиков и девочек не выявил статистически значимых различий (рис. 2), что соответствует результатам, полученным другими исследователями [21].

Количество TREC и KREC у недоношенных в разные гестационные сроки

На основе данных корреляционного анализа проведен статистический анализ с целью определения возможных вариаций количества молекул TREC и KREC, ассоциированных с разным гестационным возрастом новорожденных. Установлена статистически значимая положительная связь ($\rho = 0.446$ ($p < 0.001$)) между гестационным возрастом и количеством молекул TREC. Не обнаружено связей

между возрастом ребенка и количеством молекул KREC – маркера наивных В-клеток (рис. 3).

Количество TREC и KREC у недоношенных с разной массой при рождении

Проанализирована также зависимость между количественным содержанием маркеров наивных Т- и В-лимфоцитов и весом новорожденных. Естественно, что с увеличением срока беременности развивается и плод. В соответствии с гестационным периодом развиваются все внутренние органы и, в частности, тимус. Тимогенные ткани по мере их роста и дифференцировки обогащаются предшественниками лимфоцитов, причем теми, которые уже смогли пройти рубеж двойной рекогнизации – позитивной и негативной селекции. Это выражается в положительной корреляционной зависимо-

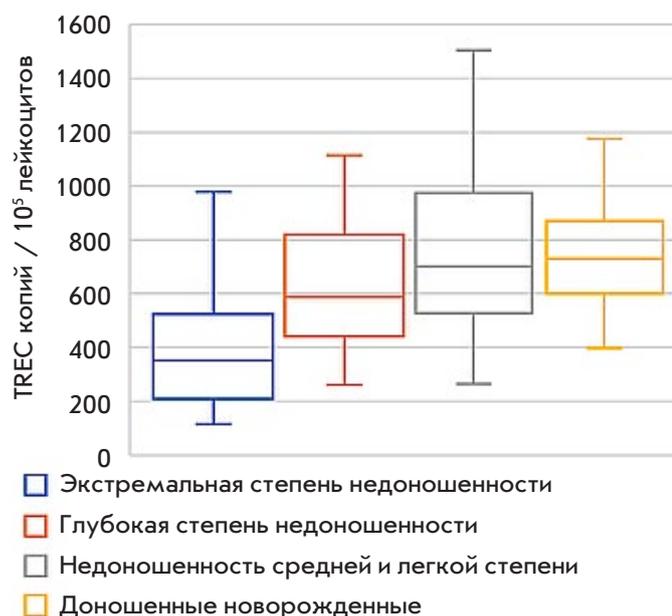


Рис. 5. Количество молекул TREC в сухих образцах крови условно здоровых детей разной степени доношенности в раннем неонатальном периоде

сти ($\rho = 0.413$ ($p < 0.001$)) между массой ребенка при рождении и количеством молекул TREC, содержащихся в сухих образцах крови новорожденных. При этом подобной корреляционной зависимости между массой ребенка при рождении и количеством молекул KREC не выявлено (рис. 4).

Анализ количества TREC и KREC у детей с разной степенью доношенности

Обнаружив положительную корреляцию между гестационным возрастом новорожденного и содер-

жанием молекул TREC, мы решили оценить возможность значимых различий в количестве молекул TREC у детей с разной степенью доношенности. С этой целью было решено разделить новорожденных на четыре группы по степени доношенности: дети с экстремальной степенью недоношенности (<28 недель), дети с тяжелой недоношенностью (28–32 недели), дети со средней и легкой степенью недоношенности (33–38 недель) и доношенные новорожденные (39–41 неделя) (рис. 5, табл. 1).

На рис. 5 видна тенденция к увеличению содержания маркера TREC во время роста и развития плода, однако статистически значимых отличий между степенью доношенности и содержанием TREC не выявлено. Поскольку не обнаружено статистически значимых зависимостей между количественным содержанием молекул KREC в сухих образцах крови с массой тела и гестационным возрастом детей с разной степенью доношенности, предложено не разделять детей на отдельные группы. В среднем в образце обнаруживалось 599.9 копий KREC на 10^5 лейкоцитов ($SE = 34.9$), однако для практического использования более важно иметь представление о нижних границах полученных референсных интервалов. Наименьшее значение KREC в группе условно здоровых детей составило 162.8 копий/ 10^5 лейкоцитов, нижняя граница 95% интервала составила 210.9 копии/ 10^5 лейкоцитов (результаты описательной статистики представлены в табл. 1).

ОБСУЖДЕНИЕ

К настоящему времени проведено множество исследований TREC/KREC в различных возрастных группах, начиная с младенцев и детей более старшего возраста и заканчивая анализом взрослого

Таблица 1. Количество молекул TREC и KREC (копий / 10^5 лейкоцитов) в сухих образцах крови условно здоровых детей разной степени доношенности в раннем неонатальном периоде

Степень доношенности	Среднее	95% интервал	Стандартная ошибка среднего	MIN	MAX
TREC					
Экстремальная недоношенность (<28 недель)	402.7	116.6–784.0	52.8	115.9	978.0
Глубокая недоношенность (28–32 недели)	611.1	271.0–917.9	52.5	261.4	1115.6
Недоношенность средней и легкой степени (33–38 недель)	776.1	378.2–1405.5	76.5	263.6	1505.6
Доношенные (39–41 неделя)	723.9	406.1–1133.2	52.2	398.1	1174.0
KREC					
	599.9	210.9–1103.5	34.9	162.8	1584.0

населения. Основная цель большинства работ состояла в оценке изменений функциональной активности «наивного» иммунитета по мере взросления и старения организма [21–23]. Согласно результатам Douek и соавт., количество молекул TREC и KREC в образцах крови детей старшего возраста и взрослых было соответственно в 10 и 100 раз ниже, чем у здоровых доношенных новорожденных. Эти данные указывают на снижение тимической эффективности, опосредованной возрастным уменьшением функционально активной ткани тимуса [24]. Изучение пациентов с комбинированным переменным иммунодефицитом (ОВИИ) и здоровых доноров контрольной группы выявило стабильность уровня KREC, тогда как уровни TREC снижались с увеличением возраста как у пациентов с иммунозависимой патологией, так и у лиц контрольной группы, что доказывает независимость снижения уровня маркеров наивных Т-клеток от заболевания и зависимость от возраста [23, 25–27]. Количество TREC и KREC может также снижаться в результате разбавления. В ходе активного иммунного ответа на этапе клеточной экспансии функционально активных клонов лимфоцитов происходит репликация только внутриядерной ДНК. Так как TREC и KREC являются эпизомными молекулами, они остаются лишь в клетке-основателе, что и приводит к относительному снижению показателей [28]. Несмотря на многочисленные данные о возрастных изменениях Т- и В-клеточного иммунитета, не менее важно исследовать динамику содержания молекул TREC и KREC не только в раннем неонатальном периоде, но и на разных этапах развития плода. Это позволит оценить состояние иммунитета на разных «срезах» эмбрионального развития человека.

Основная цель нашей работы состояла в определении содержания молекул TREC и KREC в крови детей, родившихся в разные гестационные сроки. Однако для большей информативности было решено проанализировать гендерные различия в содержании маркеров наивных иммунокомпетентных клеток. Нами не выявлено значимых различий в содержании молекул TREC и KREC в образцах сухой крови мальчиков и девочек, что соответствует результатам, полученным другими исследователями [29, 30]. С другой стороны, в некоторых работах представлены результаты, указывающие на более высокое содержание TREC в крови лиц женского пола [31–33].

К настоящему времени опубликованы данные о взаимозависимости между весом ребенка и количеством TREC [34–36]. Недавно проведенное исследование образцов сухой крови недоношенных ново-

рожденных выявило положительную связь между количеством копий TREC и KREC и массой тела при рождении [5]. В другой работе изучали зависимость не только между весом, но и сроками гестации на момент рождения. По результатам проведенного анализа новорожденных разделили на три группы – с очень низкой, низкой и нормальной массой тела при рождении [32]. Опубликованы также данные о существовании связи между состоянием иммунитета и ростом взрослых индивидов [36, 37].

Развитие всех внутренних органов, в частности тимуса, происходит в соответствии с гестационным периодом. Тимогенные ткани по мере роста и дифференцировки обогащаются предшественниками лимфоцитов, причем теми, которые уже смогли пройти рубеж двойного отбора – позитивной и негативной селекции. Это выражается в положительной корреляционной зависимости ($\rho = 0.413$ ($p < 0.001$)) между массой ребенка при рождении и количеством молекул TREC, содержащихся в образцах сухой крови новорожденных [21, 26, 27].

Мы также проанализировали зависимость между количественным содержанием маркеров В-лимфоцитов, гестационным возрастом и массой новорожденного, однако связь этих показателей не была статистически значимой. Эти результаты показывают, что количество KREC в сухом пятне крови ребенка с гестационным возрастом не менее 28 недель, соответствующее нормативным значениям, служит показателем правильного прохождения процесса созревания В-клеток в костном мозге. Известно, что пре-В-лимфоциты обнаруживаются в печени плода на 8 неделе беременности, где они уже начинают экспрессировать на своей поверхности молекулы иммуноглобулина класса М. Это свидетельствует о том, что уже на столь ранних этапах развития человека система гуморальных параметров иммунитета функционирует с высокой эффективностью, что, вероятно, проявляется в относительно высоком уровне молекул KREC, обнаруживаемых в сухих пятнах крови у детей, рожденных в разные сроки гестации [23, 27].

Врожденные ошибки иммунитета обычно не диагностируются до тех пор, пока не появятся клинические признаки, в основном такие, как хронические и рецидивирующие инфекции. Для постановки диагноза первичный иммунодефицит используют общий анализ крови, фенотипирование лимфоцитов, определение различных классов иммуноглобулинов, функциональные тесты иммунокомпетентных клеток и генетический анализ как возможность подтверждающей диагностики. Наиболее перспективными и важными в настоящее время являются функциональные тесты иммунокомпетент-

ных клеток и генетический анализ. Анализ TREC и KREC – это быстрый и чувствительный инструмент для скрининга ТКИН и диагностики других ВОИ, особенно потому, что для выделения ДНК требуется лишь небольшой объем образца, что снижает риск причинения вреда младенцам. Зачастую непреодолимым барьером в лабораторной диагностике является невозможность взятия необходимого количества биологического материала. Свой вклад в разброс пороговых значений при осуществлении программ скрининга новорожденных в разных странах вносит использование разных протоколов анализа TREC и KREC в разных лабораториях. Свою роль могут играть также популяционные генетические различия. Поэтому полученные нами результаты определения интервалов TREC и KREC, учитывающих половозрастные характеристики пациентов, имеют немаловажное значение для диагностики ВОИ у детей.

Первичные иммунодефициты все еще продолжают рассматриваться как редкие болезни, хотя они и не относятся к орфанным. В 2019 году в России было зарегистрировано 2798 пациентов с врожденными ошибками иммунитета, из которых 60% – дети [38]. Внедрение программ массового скрининга новорожденных на основе определения TREC и KREC позволит значительно увеличить группу риска по ТКИН и другим тяжелым первичным иммунодефицитам, приводящим к летальным исходам в раннем возрасте. Ранняя диагностика обеспечит возможность своевременного применения патогенетически обоснованной терапии, включая радикальные трансплантационные технологии, в период окна возможностей до появления тяжелых клинических проявлений, что приведет не только к улучшению качества жизни пациентов с такой патологией и сохранению их жизни, но и позволит сократить фи-

нансово-экономические затраты на лечение и жизнеобеспечение пациентов [39–45].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты наших исследований позволяют утверждать, что срок беременности следует рассматривать как немаловажный фактор, влияющий на количественное содержание молекул TREC и KREC. Для интерпретации результатов скрининга новорожденных мы рассчитали референсные диапазоны этих параметров для разных гестационных групп. Кроме того, это позволит осуществлять мониторинг иммунных изменений Т- и В-клеток при проведении иммуноотропной терапии, включая посттрансплантационное наблюдение после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

Ранняя диагностика и лечение важны при всех формах ВОИ. Использование метода количественной оценки маркеров Т- и В-клеточного иммунитета (TREC и KREC) сделало возможным разработку скрининговых программ по выявлению ТКИН и агаммаглобулинемии во многих странах мира. Однако остаются неохваченными другие группы ПИД, такие, как иммунодефициты с нормальным количеством периферических Т- и В-клеток, дефекты количества и функции фагоцитов, дефицит комплемента и заболевания, связанные с иммунной дисрегуляцией. Необходим дальнейший поиск эффективных маркеров патологии, разработка стратегий клеточной, генетической и функциональной диагностики, адаптация их к массовым программам диагностики различных первичных иммунодефицитов. ●

Данное исследование проведено в рамках проекта АААА-А21-121012090091-6 на базе Института иммунологии и физиологии УрО РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tangye S.G., Al-Herz W., Bousfiha A., Chatila T., Cunningham-Rundles C., Etzioni A., Franco J.L., Holland S.M., Klein C., Morio T., et al. // *J. Clin. Immunol.* 2020. V. 40. P. 24–64.
2. Rubin Z., Pappalardo A., Schwartz A., Antoon J.W. // *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 2018. V. 6. P. 1705–1710.
3. Modell V., Knaus M., Modell F., Roifman C., Orange J., Notarangelo L.D. // *Immunol. Res.* 2014. V. 60. P. 132–144.
4. Jung D., Alt F.W. // *Cell.* 2004. V. 116. P. 299–311.
5. Ye P., Kirschner D.E. // *Crit. Rev. Immunol.* 2002. V. 22. № 5–6. P. 483–497.
6. Nourizadeh M., Borte S., Fazlollahi M.R., Hammarstrom L., Pourpak Z. // *Iran J. Allergy Asthma Immunol.* 2015. V. 14. № 4. P. 457–461.
7. Ye P., Kirschner D.E. // *J. Immunol.* 2002. V. 168. P. 4968–4979.
8. Hazenberg M.D., Verschuren M.C., Hamann D., Miedema F., van Dongen J.J. // *J. Mol. Med.* 2001. V. 79. P. 631–640.
9. Barbaro M., Ohlsson A., Borte S., Jonsson S., Zetterstrom R.H., King J., Winiarski J., von Döbeln U., Hammarström L. // *J. Clin. Immunol.* 2017. V. 37. P. 51–60.
10. Siminovitsh K.A., Bakhshi A., Goldman P., Korsmeyer S.J. // *Nature.* 1985. V. 316. P. 260–262.
11. van Zelm M.C., van der Burg M., Langerak A.W., van Dongen J.J. // *Front. Immunol.* 2011. V. 2. P. 12.
12. van Zelm M.C., Szczepanski T., van der Burg M., van Dongen J.J. // *J. Exp. Med.* 2007. V. 204. P. 645–655.
13. Kong F.K., Chen C.L., Six A., Hockett R.D., Cooper M.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. V. 96. P. 1536–1540.
14. Livak F., Schatz D.G. // *Mol. Cell. Biol.* 1996. V. 16. P. 609–618.
15. Borte S., von Döbeln U., Fasth A., Wang N., Janzi M., Winiarski J. // *Blood.* 2012. V. 119. № 11. P. 2552–2555.
16. Puck J.M., Group SNSW. // *J. Clin. Immunol.* 2007. V. 120. № 4. P. 760–768.

17. Puck J.M. // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2012. V. 129. № 3. P. 607–616.
18. Корсунский И.А., Кудлай Д.А., Продеус А.П., Щербина А.Ю., Румянцев А.Г. // *Педиатрия.* 2020. Т. 99. № 2. С. 8–15.
19. King J.R., Hammarstrom L. // *J. Clin. Immunol.* 2018. V. 38. № 1. P. 56–66.
20. Claustres M., Kozich V., Dequeker E., Fowler B., Hehir-Kwa J.Y., Miller K. // *Eur. J. Hum. Genet.* 2014. V. 22. № 2. P. 160–170.
21. de Felipe B., Olbrich P., Lucenas J.M., Delgado-Pecellin C., Pavon-Delgado A., Marquez J. // *Pediatr. Allergy Immunol.* 2016. V. 27. № 1. P. 70–77.
22. Castermans E., Morrhaye G., Marchand S., Martens H., Moutschen M., Geenen V. // *Revue Med. de Liege.* 2007. V. 62. № 12. P. 725–729.
23. Geenen V., Poulin J.F., Dion M.L., Martens H., Castermans E., Hansenne I. // *J. Endocrinol.* 2003. V. 176. № 3. P. 305–311.
24. Sempowski G.D., Gooding M.E., Liao H.X., Le P.T., Haynes B.F. // *Mol. Immunol.* 2002. V. 38. № 11. P. 841–848.
25. Douek D.C., McFarland R.D., Keiser P.H., Gage E.A., Massey J.M., Haynes B.F. // *Nature.* 1998. V. 396. № 6712. P. 690–695.
26. Olbrich P., de Felipe B., Delgado-Pecellin C., Rodero R., Rojas P., Aguayo J. // *Ann. Pediatr. (Barc.).* 2014. V. 81. № 5. P. 310–317.
27. Moro-Garcia M.A., Alonso-Arias R., Lopez-Larrea C. // *Curr. Genomics.* 2012. V. 13. № 8. P. 589–602.
28. Palmer S., Albergante L., Blackburn C.C., Newman T.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2018. V. 115. № 8. P. 1883–1888.
29. Goronzy J.J., Shao L., Weyand C.M. // *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 2010. V. 36. № 2. P. 297–310.
30. Sottini A., Serena F., Bertoli D., Chiarini M., Valotti M., Vaglio Tessoro M. // *J. Vis. Exp.* 2016. V. 6. P. 94.
31. Shakerian L., Pourpak Z., Shamlou S. // *Iran J. Allergy Asthma Immunol.* 2019. V. 18. № 2. P. 143–152.
32. Yoshida K., Nakashima E., Kubo Y., Yamaoka M., Kajimura J., Kyoizumi S. // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 3. e91985.
33. Rechavi E., Lev A., Simon A.J., Stauber T., Daas S., Saraf-Levy T. // *Front. Immunol.* 2017. V. 8. P. 1448.
34. Serena F., Chiarini M., Zanotti C., Sottini A., Bertoli D., Bosio A. // *J. Transl. Med.* 2013. V. 11. P. 119.
35. Raqib R., Alam D.S., Sarker P., Ahmad S.M., Ara G., Yunus M. // *Am. J. Clin. Nutr.* 2007. V. 85. № 3. P. 845–852.
36. Pawlowski B., Nowak J., Borkowska B., Augustyniak D., Drulis-Kawa Z. // *Proc. Biol. Sci.* 2017. V. 284. P. 1859.
37. Krams I.A., Skrinda I., Kecko S., Moore F.R., Krama T., Kaasik A. // *Sci. Rep.* 2014. V. 4. P. 6223.
38. Mukhina A.A., Kuzmenko N., Rodina Y.A., Kondratenko I.V., Bologov A.A., Latysheva T.V., Prodeus A.P., Pampura A.N., Balashov D.N., Ilyina N.I., et al. // *Front. Immunol.* 2020. V. 11. P. 1491.
39. Buckley R.H., Schiff S.E., Schiff R.I., Markert L., Williams L.W., Roberts J.L. // *N. Engl. J. Med.* 1999. V. 340. P. 508–516.
40. Castagnoli R., Delmonte O.M., Calzoni E., Notarangelo L.D. // *Front. Pediatr.* 2019. V. 7. P. 295.
41. Pai S.Y., Logan B.R., Griffith L.M., Buckley R.H., Parrott R.E., Dvorak C.C. // *N. Engl. J. Med.* 2014. V. 371. P. 434–446.
42. Gardulf A., Winiarski J., Thorin M., Heibert Arnlin M., von Döbeln U., Hammarstrom L. // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2017. V. 139. P. 1713–1716.
43. Bessey A., Chilcott J., Leaviss J., de la Cruz C., Wong R. // *Int. J. Neonat. Screen.* 2019. V. 5. P. 28.
44. Thomas C., Durand-Zaleski I., Frenkiel J., Mirallie S., Leger A., Cheillan D. // *Clin. Immunol.* 2019. V. 202. P. 33–39.
45. Козлов В.А., Тихонова Е.П., Савченко А.А., Кудрявцев И.В., Андропова Н.В., Анисимова Е.Н., Головкин А.С., Демина Д.В., Здзитовецкий Д.Э., Калинина Ю.С. и др. *Клиническая иммунология. Практическое пособие для инфекционистов.* Красноярск: Поликор, 2021. 563 с.

УДК 636.2.082.2

Геномная оценка племенной ценности молочных коров черно-пестрой породы по совокупности признаков молочной продуктивности и признаков фертильности

Ф. С. Шарко^{1*}, А. Хатиб^{2,3,4}, Е. Б. Прохорчук^{1,2}¹ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия²ЗАО «Геноаналитика», Москва, 119234 Россия³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия⁴Комиссия по атомной энергии Сирий (AECS), Департамент сельского хозяйства, Дамаск, 6091 Сирия

*E-mail: fedosic@gmail.com

Поступила в редакцию 30.11.2021

Принята к печати 14.01.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11648

РЕФЕРАТ Внедрение в селекционные программы данных о геноме животных стало прорывом в селекции крупного рогатого скота. С 2010 года геномная селекция стала официальной системой оценки племенных качеств скота в Европе, США, Канаде и многих развитых странах. Цель данной работы состояла в разработке системы геномной оценки племенной ценности отечественного поголовья крупного рогатого скота черно-пестрой и голштинской породы по трем признакам молочной продуктивности (суточный удой (кг), суточный молочный жир (%) и суточный молочный белок (%); и по шести признакам фертильности (возраст от первого отела (AFC); межотельный период (CI); интервал от отела до первого осеменения (OFI); интервал от первого до последнего осеменения (FLI); длина сервис-периода (DO) и кратность осеменения (NS)). Сформирована единая база данных племенных животных для 523 племенных хозяйств Российской Федерации. В базу данных вошла информация о происхождении 2551529 коров и 69131 быка-производителя молочного направления продуктивности голштинской и черно-пестрой породы, а также информация о продуктивности 1597426 коров с законченными 4771366 лактациями. Даты рождения животных, вошедших в базу данных, – 1975–2017 годы. Проведено генотипирование 672 животных с использованием микроматрицы BovineSNP50 v3 DNA Analysis BeadChip (Illumina, США). Проведена геномная оценка племенной ценности (GEBV) только 644 животных голштинской и черно-пестрой породы (427 быков и 217 коров) (список доступен по ссылке <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.18673583.v1>) с использованием метода одношагового геномного лучшего линейного несмещенного прогноза – модель животного (ssGBLUP-AM). Средний генетический потенциал животных составил +0.88 и +1.03 кг по суточному удою, -0.002% по содержанию жира в молоке и -0.003 и 0.001% по содержанию белка в молоке у коров и быков соответственно (генетический потенциал, который передается на потомство). Установлен отрицательный генетический прогресс по признакам фертильности в популяции за период 1975–2017 годы. Достоверность оценки племенной ценности по качеству потомства (EVB) генотипированных быков варьировала от 89 до 93% по молочным признакам и от 85 до 90% по признакам фертильности. По геному достоверность оценки варьировала от 54 до 64% по молочным признакам и от 23 до 60% по признакам фертильности. Этот результат показывает возможность применения геномной оценки племенной ценности (с довольно высокой достоверностью) отечественного поголовья КРС голштинской и черно-пестрой породы по совокупности признаков фертильности и молочной продуктивности. Система геномной оценки племенной ценности позволит вывести отечественную племенную работу на современный конкурентоспособный уровень и оценивать племенную ценность КРС уже при рождении на основании информации о геноме животного.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА GEBV, черно-пестрая порода, генотипирование, тестовый день, молочная продуктивность, фертильность.

ВВЕДЕНИЕ

Один из самых сложных этапов селекции сельскохозяйственных животных – оценка их племенной ценности. Сложность заключается в том, что для определения племенной ценности необходимо сравнить и проанализировать селекционные характеристики у самих оцениваемых животных, их ближайших родственников, потомков и предков. На начальных этапах развития животноводства племенную ценность оценивали по фенотипическим показателям, в частности, в молочном скотоводстве использовали показатели молочной продуктивности [1, 2]. Однако в последнее десятилетие разработаны более эффективные методы оценки племенной ценности, основанные на применении молекулярно-генетических маркеров. Существенного прогресса удалось достичь благодаря расшифровке генома основных сельскохозяйственных животных (крупного рогатого скота (КРС), свиней и овец) [3], а также применению статистического анализа, в частности, метода наилучшего линейного несмещенного прогноза (BLUP). Расчет племенной ценности на основе метода BLUP позволяет исключить влияние негенетических факторов на изменчивость отобранных признаков в популяции, а также выделить и оценить генетическую составляющую с высокой степенью достоверности [4]. Использование молекулярно-генетических маркеров повышает надежность оценки племенной ценности молодых особей, сокращает интервал генерации и расширяет возможности интенсивного отбора. Кроме того, применение геномной оценки приводит к росту темпов генетического улучшения хозяйственно полезных признаков коров и к снижению материально-технических затрат на оценку генетического потенциала быков-производителей [5, 6]. Особенное значение геномная оценка имеет для показателей здоровья и фертильности, так как надежность геномной оценки племенной ценности только немного уступает надежности этих показателей по качеству потомства. На данный момент отсутствует значительный генетический прогресс в оценке по признакам фертильности, поскольку целому ряду этих признаков долгое время не уделяли должного внимания в селекционных программах [7]. Достоверность геномной оценки племенной ценности молодых животных зависит от достоверности оценки животных, вошедших в референсную популяцию – популяцию быков-производителей, имеющих высоко достоверную оценку по потомству и информацию о геноме [8]. Так как получение информации о геноме является стандартизированной и отработанной технологией, достоверность геномной оценки племенной ценности в большей степени зависит от достоверности оценки животных, вошедших в ре-

ференсную популяцию, по потомству. На практике, для признаков молочной продуктивности оценка племенной ценности по потомству основана на использовании показателей удоя за 305 дней лактации [9]. Удой за 305 дней лактации рассчитывается с использованием ежемесячных суточных измерений объема молока, а также процентного содержания жира и белка в нем. Такие измерения получили название «тестовые дни» [10]. Использование молочной продуктивности за 305 дней лактации для оценки племенной ценности по потомству наряду с некоторыми преимуществами имеет ряд недостатков. Во-первых, эта процедура расчета удоя [11] основана на построении кривой лактации по результатам «тестовых дней» с использованием фиксированных параметров, что приводит к занижению молочной продуктивности в течение первых месяцев лактации и к ее завышению в течение последних месяцев лактации. Эти погрешности могут приводить к некорректному расчету удоя за 305 дней лактации и снижению достоверности оценки племенной ценности по потомству на основании таких первичных данных, а следовательно, и к снижению достоверности геномной оценки племенной ценности. Во-вторых, при использовании значения «Удой за 305 дней лактации» в математических моделях линейного и нелинейного типа в качестве фиксированного фактора, влияющего на изменчивость этого значения, используется усредненный эффект окружающей среды для этой лактации (эффект стада-года-сезона отела), подразумевая, что в течение всей лактации этот эффект был постоянным [12]. На практике этот эффект может сильно варьировать от одного дня лактации к другому [13]. Игнорирование вариативности эффекта окружающей среды на суточную молочную продуктивность приводит к некорректному расчету генетических и паратипических параметров при оценке племенной ценности, а также вносит погрешность в оценку племенной ценности по потомству и по геному. Использование результатов суточной молочной продуктивности напрямую при построении математических моделей оценки племенной ценности позволяет решить все рассмотренные проблемы [14]. Такие математические модели получили название модели тестового дня, или TD-модели [15]. Цель нашей работы состояла в разработке системы геномной оценки племенной ценности отечественного поголовья КРС голштинской и черно-пестрой породы с применением метода TD ssGBLUP-AM по совокупности признаков молочной продуктивности (суточный удой (кг), молочный жир (%), молочный белок (%)) и метода ssGBLUP-AM по признакам фертильности: возраст от первого отела (AFC, дни); межотельный период (CI, дни);

интервал от отела до первого осеменения (OFI, дни); интервал от первого до последнего осеменения (FLI, дни); длина сервис-периода (DO, дни) и кратность осеменения (NS).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

База данных информации о племенных животных

Сформирована единая база данных о фенотипических показателях исследуемых признаков и о происхождении животных из 12 регионов Российской Федерации. Для формирования единой базы использовали первичные базы информации о животных из 523 предприятий, внесенных в реестр племенных организаций Министерства сельского хозяйства Российской Федерации. Первичные необработанные данные получены в виде баз данных, сгенерированных с помощью набора программ СЕЛЕКС [16], которые относятся к реляционной СУБД Firebird 2.5. Работу с базами данных и выгрузку необходимой информации проводили с помощью языка программирования Python 2.7 и пакета FDB. Была выгружена информация о показателях фертильности и молочной продуктивности, а также о происхождении каждого животного с законченной лактацией, входившего в 523 локальные базы данных. В качестве информации о молочной продуктивности для каждого животного выгружали информацию о TD (день, когда собираются показатели молочной продуктивности животного за контрольный дойный день) для каждой лактации: информация о суточном удое, суточном проценте жира и суточном проценте белка. В качестве информации для формирования базы фенотипических данных по признакам фертильности выгружали информацию о дате отела каждого животного, возрасте при отеле, дате и кратности осеменения. Также была выгружена вся первичная информация о происхождении всех животных с известной продуктивностью, а также информация обо всех известных поколениях предков по отцовской и материнской линии.

Система оценки достоверности фенотипических данных племенных животных, входящих в созданную базу данных

При анализе единой базы данных племенных животных обнаружено, что первичные данные содержат большое количество ошибок и неточностей. Это не позволяет использовать такие данные для проведения дальнейших исследований. С целью исправления сложившейся ситуации разработана уникальная многоступенчатая система проверки достоверности данных о молочной продуктивности,

которая включает пять основных этапов: проверка данных на критические значения, проверка продолжительности стельности, проверка изменчивости данных о молочной продуктивности внутри каждого хозяйства, проверка количества тестовых дней в лактации и анализ достоверности данных о молочной продуктивности внутри каждой лактации. Все лактации, вошедшие в созданную единую базу данных, проходили проверки последовательно по каждому этапу. Лактации, информация о которых не проходила проверку на качество, удаляли из дальнейшего анализа.

Прежде всего из базы были удалены данные о молочной продуктивности, значения которых были меньше или равны 0. Далее данные о молочной продуктивности проверяли на попадание в интервал ($\mu - 3\sigma$, $\mu + 3\sigma$) и удаляли не попавшие. Стоит отметить, что при удалении значений по суточному удою отбрасывали также данные по молочному жиру и молочному белку независимо от того, прошли ли они проверку или нет.

На следующем этапе проверяли продолжительность стельности для каждой лактации также по правилу «трех сигм» [17]. Предварительно были удалены ошибочные неположительные значения. В результате проверки прошли лактации, которые соответствовали продолжительности стельности от 268 до 317 дней. Лактации, продолжительность предварительной стельности перед которыми не попадала в доверительный интервал, из дальнейшего анализа удаляли.

На третьем этапе проверки, чтобы исключить данные, полученные методом копирования единоразово полученных значений, проведен контроль изменчивости признаков внутри стада в каждом хозяйстве. В результате такой проверки из дальнейшего анализа были удалены значения признаков в каждом хозяйстве, если за каждый контрольный дойный день, неделю или месяц в данных предприятиях обнаруживали одинаковые значения.

Следующим этапом проверки достоверности данных молочной продуктивности была проверка количества и качества тестовых дней в каждой лактации. Согласно утвержденным правилам оценки молочной продуктивности коров [18], данные проверили на соответствие следующим условиям:

- 1) должны быть данные о не менее трех тестовых днях в лактации;
- 2) между датой отела и датой первого TD должно пройти не более 70 дней;
- 3) между смежными TD должно быть не более 70 дней.

Лактации, которые не подходили по этим правилам, удаляли. Стоит отметить, что если удаляли

данные по признаку «Суточный удой в кг», то удаляли всю лактацию.

На следующем этапе проверки, для каждой лактации, информации о суточных удоях которой прошли предыдущие этапы проверки, была построена кривая лактации с использованием международных признанных методик [19, 20]. Для каждой построенной лактационной кривой по каждому признаку рассчитывали средние абсолютные ошибки аппроксимации (Mean Absolute Error, MAE). Результаты, полученные для каждого признака, образуют нормально распределенную выборку значений. В результате анализа рассчитанных средних абсолютных ошибок аппроксимации для каждой лактации из дальнейшего расчета исключали лактации, которые имели слишком большую ошибку аппроксимации (не вошли в промежуток $(0, \mu + 3\sigma)$).

Первичные данные по признакам фертильности проверяли для каждого признака по отдельности. По признаку возраста первого отела удаляли данные, значение которых не совпадало с интервалом 18–30 месяцев. Данные по межотельному периоду проверяли таким образом, что в базу данных включали только те лактации, которые соответствовали межотельному периоду от 300 до 600 дней. Также в созданную базу вошли данные, значения которых составили от 25 до 360 дней для признака интервала отела – первого осеменения (OFI) и от 25 до 500 дней для признаков первого–последнего осеменения (FLI) и длины сервис-периода (DO). Проверку достоверности данных о кратности осеменения (NS) проводили на соответствие условию, что данное значение не должно превышать 10 осеменений на лактацию.

Система оценки достоверности информации о происхождении племенных животных

Из единой базы данных удаляли информацию о происхождении всех животных, данные о лактации которых были удалены в рамках проверки достоверности данных о фертильности и молочной продуктивности. Первичный анализ показал, что качество данных о происхождении животных не позволяет проводить дальнейшие исследования, так как содержит большое количество дубликатов, ошибок и неточностей.

На первом этапе корректировки данных о происхождении животных разработан уникальный алгоритм исправления зацикливаний в существующей первичной базе данных. Основная идея алгоритма – присвоить животному номер поколения и проанализировать его изменения. Первоначально каждое животное в таблице родства имеет значение «1». Если по ходу прохождения последовательно по та-

блице встречаются потомки какого-либо животного, то номер поколения, в котором он находится, увеличивается на единицу. Если потомок животного имеет номер поколения выше, то соответственно необходимо пропорционально увеличить номер поколения животного. Алгоритм продолжает работу пока не перестанут изменяться номера поколений животных. Соответственно, животное с самым большим номером поколения является родоначальником. В том случае, если есть ошибки в данных какого-то животного и имеются циклы, его номер поколения не перестанет увеличиваться. Животных с такой аномалией удаляли из базы данных о происхождении. Разработанный алгоритм позволил удалить ошибочные данные такого рода.

Следующим этапом корректировки сформированной базы родства стало формирование комбинированной базы данных о происхождении животных с использованием референсной базы данных. Этот этап заключается в интеграции животных из созданной базы данных в уже имеющуюся в открытом доступе базу происхождения племенных животных молочных пород CDCB (Council of Dairy Cattle Breeding, США) [21] как самая полная база данных по молочным породам в мире. Информацию о происхождении животных, полученную из этой базы данных, считали референсной. Далее на основании данных о происхождении животных, полученных из российских и зарубежных источников, были построены два генеалогических дерева и проведен поиск совпадений вершин этих деревьев. Условия поиска – совпадение пола + части номера + даты рождения или совпадение пола + номера, длина которого более 7 цифр. При совпадении вершин все записи о предках этого животного, полученные из российских источников, заменяли референсными. Это, кроме прочего, позволило восполнить недостаток информации в наших базах данных и объединить ветви генеалогического дерева, построенного по российским данным, которые без зарубежной базы никогда бы не пересеклись.

После формирования комбинированной базы данных о происхождении животных, приводилась группировка дубликатов одних и тех же предков животных с законченной лактацией. Прежде всего, записи, которые не подверглись замене в рамках предыдущего этапа, группировались между собой по совпадению клички, + даты рождения, или инвентарного номера + клички, или инвентарного номера + даты рождения. Каждой группе записей был присвоен уникальный номер в хронологическом порядке. Ошибочные данные удаляли в том случае, если в одной группе записей родителям (отцу или матери) присвоено два или более уникальных

номера. Далее данные группировали с учетом межродственных связей (совпадение отца или матери + совпадение каких-либо личных данных (клички, номера или даты рождения)).

Также мы апробировали метод восстановления части недостающей информации в матрице родства путем итерационной оценки матрицы R (ковариационная матрица остаточной ошибки e) для АМ-модели. Мы применяем *EM-алгоритм* [22] – алгоритм, используемый в математической статистике для нахождения оценок максимального правдоподобия параметров вероятностных моделей в случае, когда модель зависит от некоторых скрытых переменных. Сначала оценивают латентные переменные по текущему приближению параметров, а затем находят оценку параметров, максимизирующую правдоподобие оценки латентных переменных и повторяют до тех пор, пока не сойдется к максимуму правдоподобия. В первом приближении мы считаем, что матрица R – диагональная. Решив АМ-модель с ней, мы получаем оценку внутренних параметров (β и u) модели, а затем в следующей итерации находим следующее приближение оценки матрицы R , используя ту же АМ-модель, тем самым улучшая точность оценки нашей АМ-модели.

Проведение генотипирования животных

Генотипировали 672 животных. ДНК выделяли из крови и кожных выщипов согласно стандартному протоколу QIAamp® DNA Investigator. Генотипирование образцов, содержащих 4 мкл раствора ДНК с концентрацией 50 нг/мкл, проведено с использованием микроматрицы BovineSNP50 v3 DNA Analysis BeadChip (Illumina, США) согласно инструкции к этим микроматрицам. Для разработки системы геномной оценки племенной ценности использовали только генотипы с значением call rate > 90%. Все SNP-маркеры, минорная частота аллелей которых составила менее 5%, из анализа исключали.

Определение породы методом главных компонент (PCA)

С помощью метода PCA мы смогли ориентировочно определить породы животных, информация о которых отсутствовала в нашей базе данных. В этом методе использовали генотипы 672 животных различных пород и программу plink.

Таким образом, на *рис. 1* мы видим четкое разделение животных джерсейской и айрширской породы, а также большой кластер животных из семейства черно-пестрых. Метод позволил определить 644 животных (427 быков-производителей и 217 коров), относящихся к голштинской (392) и черно-пестрой (252) породам, которых использовали в дальнейшем для оценки племенной ценности.

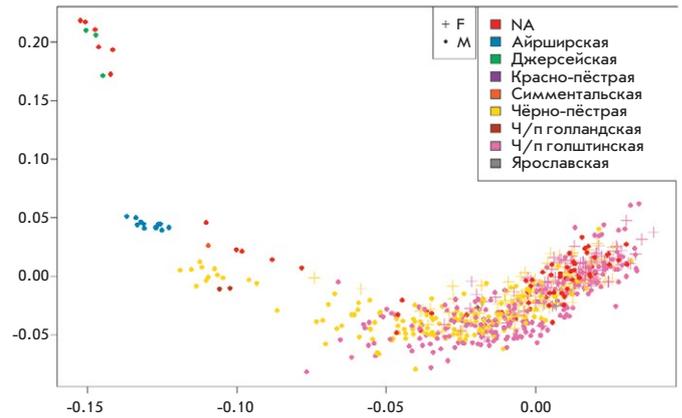


Рис. 1. Метод главных компонент PC1 и PC2 (PCA) для генотипированных животных

строй (252) породам, которых использовали в дальнейшем для оценки племенной ценности.

Оценка племенной ценности и генетических параметров популяции животных черно-пестрой породы

Племенную ценность животных оценивали методом TD ssGBLUP-AM [23, 24] для признаков молочной продуктивности и методом ssGBLUP-AM [25] для признаков фертильности. Были сформированы следующие фиксированные модели:

$$\begin{aligned}
 Y &= X_1A + X_2HYS_c + X_3L + X_4TD + Z_1a + Z_2p + e \\
 AFC &= X_1RYS_b + X_2H + Z_1a + e \\
 CI &= X_1RYS_c + X_2H + X_3LA + Z_1a + Z_2p + e \\
 OFI &= X_1RYS_c + X_2H + X_3LA + Z_1a + Z_2p + e \\
 FLI &= X_1RYS_i + X_2H + X_3LA + Z_1a + Z_2p + e \\
 DO &= X_1RYS_c + X_2H + X_3LA + Z_1a + Z_2p + e \\
 NS &= X_1RYS_i + X_2H + LA + Z_1a + Z_2p + e,
 \end{aligned}$$

где Y – вектор по показателям молочной продуктивности (удой (кг); содержание жира (%); выход молочного жира (кг); содержание белка (%); выход молочного белка (кг)); AFC – вектор показателей признака возраст от первого отела (дни); CI – вектор наблюдений показателей признака межотельного периода (дни); OFI – вектор наблюдений признака интервала от отела до первого осеменения (дни); FLI – вектор наблюдений признака интервал от первого до последнего осеменения (дни); DO – вектор наблюдений признака длина сервис-периода (дни); NS – вектор наблюдений признака кратности осеменения; A – вектор фиксированного эффекта возраст животных; HYS_c – вектор фиксированного эффекта хозяйство-год-сезон отела; RYS_b – вектор фиксированного эффекта регион-год-сезон рождения; L – вектор фиксированного эффекта номера лактации; H – вектор

фиксированного эффекта хозяйство; TD – вектор фиксированного контрольного дойного дня; RYSc – вектор фиксированного эффекта регион-год-сезон отела; RYSi – вектор фиксированного эффекта регион-год-сезон осеменения; LA – вектор фиксированного эффекта лактация-возраст животного; а – вектор рандомизированных аддитивных эффектов животного; р – вектор рандомизированных эффектов окружающей среды; е – вектор остаточных эффектов; X_1, X_2, X_3, Z_1 и Z_2 – единичные диагональные матрицы, связывающие вектор наблюдений с векторами фиксированных и случайных эффектов.

Расчет генетических параметров (коэффициента наследуемости и повторяемости) проводили по следующим формулам [26]:

$$h^2 = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_a^2 + \sigma_p^2 + \sigma_e^2}$$

$$R = \frac{\sigma_a^2 + \sigma_p^2}{\sigma_a^2 + \sigma_p^2 + \sigma_e^2},$$

где h^2 – коэффициент наследуемости; R – коэффициент повторяемости; σ_a^2 – аддитивная генетическая дисперсия; σ_p^2 – дисперсия окружающей среды; σ_e^2 – дисперсия остаточных эффектов.

Достоверность оценки племенной ценности рассчитывали с использованием следующей формулы [27]:

$$REL = 1 - \frac{PEV}{(1+F)\sigma_a^2},$$

где REL – достоверность оценки племенной ценности; PEV – прогнозируемая дисперсия ошибок; F – коэффициент инбридинга; σ_a^2 – аддитивная генетическая дисперсия.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика базы данных племенных животных российской популяции КРС черно-пестрой породы

С использованием разработанной системы сформирована уникальная сводная база данных о происхождении племенных животных по отцовской и материнской линии, в которую вошла информация о 69131 быках и 251529 коровах черно-пестрой породы молочного направления продуктивности. Разработанная система позволяет скомбинировать разнородную информацию о происхождении племенных животных молочного направления продуктивности для 523 хозяйств Российской Федерации. Даты рождения животных по вошедшим в базу данных лактациям распределились между 1975 и 2017 годами, среднее количество тестовых

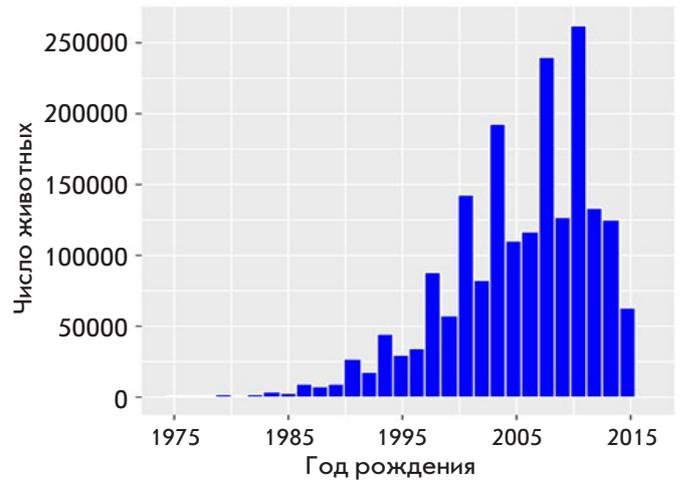


Рис. 2. Распределение животных в базе данных по дате рождения

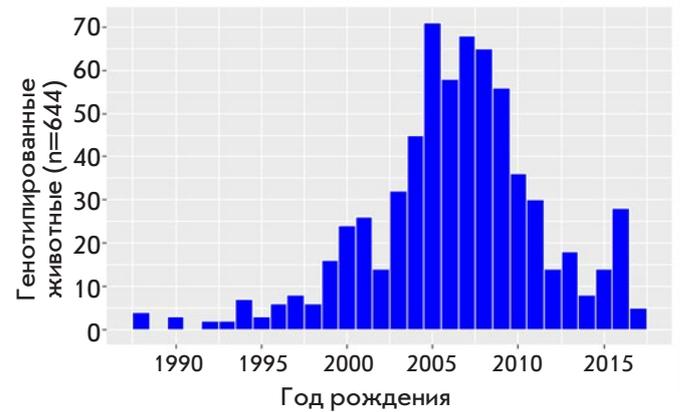


Рис. 3. Распределение генотипированных животных по дате рождения

дней, приходившихся на одну лактацию, равно 9. Распределение животных в созданной базе и распределение генотипированных животных по дате рождения представлено на рис. 2 и рис. 3.

После апробации системы проверки фенотипических данных и данных о происхождении животных в итоговую базу вошла информация о 1 597426 коров с законченными 4771366 лактациями. Известны данные о суточном удое, молочном жире и молочном белке 1047224, 1033839, 1046148 животных соответственно. Число записей тестового дня составило 29735417, 26393276 и 26955476 соответственно по суточному удою, содержанию жира и белка в молоке. Таблица родства по трем признакам молочной продуктивности содержала информацию о 1983031 животном, из которых 51810 – быки-производители. Среднее значение продуктивности всего поголовья составило 20.9 ± 8.433 кг по суточному удою, $3.90 \pm 0.46\%$ по содержанию жира в молоке и $3.18 \pm 0.24\%$ по содержанию белка в молоке.

Таблица 1. Показатели племенных животных российской популяции КРС голштинской и черно-пестрой породы

Признак	Число животных	Число записей	Число животных в таблице родства	Число быков	Мин	Макс	Среднее	Стандартное отклонение
Суточный удой, кг	1047224	29735417	1983031	51810	0.2	46.211	20.90	8.43
Молочный жир, %	1033839	26393276	1983031	51810	2.38	5.47	3.90	0.46
Молочный белок, %	1046148	26955476	1983031	51810	2.31	4.08	3.18	0.24
AFC, дни	937175	937175	1434321	49644	540	1230	836.06	117.32
CI, дни	763773	2026259	1247553	46371	300	600	401.79	67.1
OFI, дни	904999	2535158	1409240	49111	25	360	90.713	53.43
FLI, дни	787536	3174412	1214206	47352	0	720	41.685	79.24
DO, дни	898131	2539399	1400007	48964	25	500	140.18	89.81
NS	959501	3575124	1447815	49781	1	10	1.80	1.39

Таблица 2. Результат расчета генетической вариансы (σ_a^2), вариансы окружающей среды (σ_p^2), остаточной вариансы (σ_c^2), коэффициента повторяемости (R) и коэффициента наследуемости (h^2)

Признак	σ_a^2	σ_p^2	σ_c^2	h^2	R
Суточный удой, кг	4.644 ± 0.783	5.278 ± 0.545	13.536 ± 0.112	0.20	0.427
Молочный жир, %	0.108 ± 0.189	0.109 ± 0.130	0.127 ± 0.610	0.31	0.631
Молочный белок, %	0.221 ± 0.431	0.261 ± 0.302	0.364 ± 0.172	0.26	0.569
AFC, дни	2025 ± 24.12	-	7515 ± 19.09	0.21	-
CI, дни	215.98 ± 4.896	334.3 ± 4.762	3736.6 ± 4.646	0.05	0.13
OFI, дни	232.02 ± 3.172	147.42 ± 2.569	2187.5 ± 2.375	0.09	0.15
FLI, дни	296.58 ± 5.141	438.19 ± 4.523	4861.7 ± 4.462	0.05	0.13
DO, дни	505.30 ± 9.534	1070.8 ± 8.925	6183.1 ± 6.994	0.07	0.2
NS	0.961 ± 0.423	0.522 ± 0.341	0.731 ± 0.254	0.11	0.19

Среднее значение по признаку возраста от первого отела составило 836.06 ± 117.32 дня. По остальным показателям фертильности среднее значение составило: 401.79 ± 67.098 дней по межотельному периоду; 90.713 ± 53.425 дней по интервалу отела–первого осеменения; 41.685 ± 79.243 дней по интервалу первого–последнего осеменения; 140.18 ± 89.805 дней по длине сервис-периода и 1.80 ± 1.39 по кратности осеменения (табл. 1).

Результат оценки генетических параметров селекционных признаков в популяции КРС голштинской и черно-пестрой породы

Для оценки племенной ценности животных в популяции КРС необходимо определить параметры селекционных признаков у животных в популяции. Определены следующие генетические параметры российской популяции голштинской и черно-пестрой породы: фенотипическая варианса, генетическая варианса, варианса факторов окружающей среды, остаточная варианса, коэффициент повторяемости и коэффициент наследуемости. Для расчета дисперсионных компонент использован модуль AIREMLF90, который, в свою очередь, основан на алгоритме AI-REML (Average Information-

Residual Maximal Likelihood). Результат расчета генетических параметров представлен в табл. 2.

Результат расчета компонентов вариансы показывает, что уровень вариабельности признаков фертильности и молочной продуктивности в популяции КРС голштинской и черно-пестрой породы в России достаточно высок, что делает достаточно эффективным ведение направленной селекционной работы по этим признакам. Значение коэффициента наследуемости составило 0.20 по суточному удою, 0.31 по содержанию жира в молоке и 0.26 по содержанию белка в молоке. По всем признакам фертильности, кроме AFC, коэффициент наследуемости имел низкое значение < 0.11 . Это указывает на низкое генотипическое разнообразие популяции животных и на высокое влияние условий окружающей среды на изменчивость данных признаков.

Результаты оценки племенной ценности коров и быков-производителей голштинской и черно-пестрой породы

Рассчитывали геномную племенную ценность всех животных, рожденных в период с 1975 по 2017 год и представленных в созданной базе данных. Племенную ценность (EBV) рассчитывали мето-

Таблица 3. Результат оценки племенной ценности коров и быков-производителей по основным селекционным признакам фертильности и молочной продуктивности в популяции КРС голштинской и черно-пестрой породы

Признак	EBV (коровы)				EBV (быки)			
	Мин	Макс	Среднее	Достоверность (среднее)	Мин	Макс	Среднее	Достоверность (среднее)
Суточный удой, кг	-11.23	13.98	0.88	0.38	-12.05	15.07	1.03	0.33
Молочный жир, %	-0.55	0.69	-0.002	0.39	-0.97	0.73	-0.002	0.34
Молочный белок, %	-0.22	0.31	-0.003	0.37	-0.18	0.30	0.001	0.32
AFC, дни	-142.66	170.45	-11.35	0.35	-199.83	198.35	-10.67	0.32
CI, дни	-34.37	49.54	2.76	0.28	-36.68	49.88	3.07	0.26
OFI, дни	-51.45	56.24	-2.02	0.33	-66.5	73.9	-0.73	0.30
FLI, дни	-40.38	82.07	5.93	0.30	-48.52	94.69	5.85	0.27
DO, дни	-53.94	72.18	3.25	0.29	-68.83	106.07	4.14	0.27
NS	-1.03	2.18	0.14	0.23	-1.08	1.66	0.05	0.21

дом ssGBLUP-AM. Этот метод позволяет включить в единичную модель информацию о фенотипе и генотипе животных, а также информацию о родословной животных. На всех шагах оценки племенной ценности использовали семейство программ BLUPF90 [27]. Результат оценки племенной ценности приведен в *табл. 3*.

Средний генетический потенциал составил 0.88 кг у коров и 1.03 кг у быков по суточному удою, -0.002% по содержанию жира в молоке и -0.003 и 0.001% по содержанию белка в молоке у коров и в потомстве быков соответственно. Необходимо отметить, что средние значения оценки по каждому признаку близки к нулю, а распределение животных относительно этого значения практически симметричное (1 : 1), т.е. 50% животных имеют положительные значения, а другие 50% – отрицательные. Генетический тренд по основным селекционным признакам фертильности и молочной продуктивности в популяции черно-пестрой породы построен с использованием средней рассчитанной племенной ценности животных по году рождения и представлен на *рис. 1* (Приложение).

Значительное повышение удоя (4.4 кг/день) наблюдалось за период с 1975 до 2017 года, при этом в период с 1975 до 2002 года отмечено снижение содержания белка в молоке. Затем с 2002 по 2017 год среднее значение племенной ценности животных увеличивалось с - 0.006 до 0.002%. После 2010 года генетический тренд по содержанию жира показывает значительное падение с -0.005 до -0.03%. Показано снижение всех показателей фертильности, кроме возраста первого отела, в период с 1975 до 2017 года.

Один из факторов, влияющих на точность оценки племенной ценности, – это уровень наследу-

емости признака. Чем выше наследуемость, тем выше точность оценки. В нашей работе точность EBV для трех признаков молочной продуктивности и признака фертильности AFC выше точности EBV для остальных признаков фертильности (CI, OFI, FLI, DO и NS). Однако коэффициент наследуемости у AFC и молочных признаков варьировал от 0.20 до 0.31, а у остальных признаков фертильности – от 0.05 до 0.11.

Оценка результативности системы геномной оценки молочного скота

Достоверность геномной оценки племенной ценности определяли методом кросс-валидации. Генотипированные животные были разделены случайным образом на 11 равных групп. 10 групп использовали по очереди для расчета модели. Оставшаяся 11-я группа была тестовой – данные о потомках животных этой группы были удалены, а племенную ценность рассчитывали только по геному. После этого племенную ценность животных сравнивали с их племенной ценностью с использованием фенотипических данных. Критерием достоверности геномной оценки племенной ценности служила степень корреляции между значениями племенной ценности генотипированных животных, рассчитанная по потомству (EBV), и их племенной ценностью, рассчитанной по генотипу (GEBV). Результат оценки достоверности геномного прогноза представлен в *табл. 4*.

Точность оценки племенной ценности по потомству (EBV) рассчитывали на основе вариационных компонентов и генетической изменчивости признаков методом REML, а точность GEBV – как квадрат рангового коэффициента корреляции между значениями EBV и GEBV. Стоит отметить, что у быков-

Таблица 4. Результат расчета достоверности геномной оценки племенной ценности по основным селекционным признакам фертильности и молочной продуктивности в популяции КРС черно-пестрой породы

Признак	Генотипированные коровы (n = 217)			Генотипированные быки (n = 427)		
	Количество потомков (среднее)	Достоверность EBV	Достоверность GEBV*	Количество потомков (среднее)	Достоверность EBV	Достоверность GEBV*
Суточный удой, кг	1.02	0.59	0.98	583.2	0.93	0.65
Молочный жир, %	1.02	0.59	0.97	583.2	0.92	0.54
Молочный белок, %	1.02	0.57	0.97	583.2	0.89	0.54
AFC, дни	0.08	0.21	0.82	358.2	0.89	0.24
CI, дни	0.05	0.15	0.87	285.1	0.87	0.60
OFI, дни	0.08	0.21	0.93	347.1	0.87	0.45
FLI, дни	0.08	0.20	0.54	219.4	0.86	0.26
DO, дни	0.08	0.20	0.93	345.5	0.90	0.56
NS	0.09	0.18	0.51	359.1	0.85	0.23

*Достоверность оценки по сравнению с оценкой по потомству (квадрат рангового коэффициента корреляции).

производителей потомков значительно больше, чем у коров. В нашем исследовании среднее количество потомков у генотипированных быков варьировало от 219.4 для FLI и до 583.2 для признаков молочной продуктивности. У генотипированных коров среднее количество потомков не превышало 1.02 для всех исследуемых признаков, в то время как достоверность EBV зависит в основном от количества потомков. Как показано в табл. 4, достоверность EBV генотипированных коров меньше, чем у быков. У генотипированных быков наблюдается высокая точность EBV (> 85%) по всем признакам фертильности и молочной продуктивности, а у генотипированных коров достоверность EBV варьировала от 0.18 по NS до 0.59 по удою и содержанию жира в молоке.

Корреляция EBV и GEBV (достоверность GEBV) превысила 80% у генотипированных коров по большинству исследуемых признаков и достигла 98% по суточному удою.

При расчете GEBV удаляли данные о потомках генотипированных животных, а племенную ценность оценивали только по генотипу. Генотипированные коровы имеют мало потомков, поэтому удаление потомков из модели ssGBLUP не влияет существенно на значения EBV животных и, соответственно, наблюдается высокая корреляция между значениями EBV и GEBV. Таким образом, в отличие от быков-производителей, достоверность GEBV у генотипированных коров не может отражать результативность системы геномной оценки.

У генотипированных быков выявлены средние значения достоверности GEBV по трем признакам молочной продуктивности. Этот результат указывает на возможность оценки племенной ценности

поголовья КРС черно-пестрой породы по генотипу с достоверностью до 65% по суточному удою и до 54% по содержанию жира и белка в молоке. Для признаков CI, DO и OFI установлена довольно высокая точность GEBV: 60, 54 и 45% соответственно. Минимальное значение точности GEBV получено для признаков AFC (24%), FLI (26%) и NS (23%).

Появление геномной селекции привело к снижению требований к традиционным подходам выбора кандидатов для отбора, при которых необходимо определить множество фенотипических признаков всех близких родственников кандидатов. Геномная селекция открывает возможность выбора признаков, которые сложно или дорого измерить, таких, как фертильность. Этот подход будет развиваться за счет новых геномных исследований (на основе геномики, транскриптомики и протеомики), направленных на выявление генов и путей, контролирующих фертильность крупного рогатого скота, и позволит улучшить фенотипирование для репродуктивной функции.

Результат оценки достоверности геномного прогноза у генотипированных быков и коров также представлен на рис. 4 и 5.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты племенной работы подтвердили, что прогноз племенной ценности КРС с использованием геномной информации более точен, чем только по родству [28–30]. В нашем исследовании впервые в России проведена геномная оценка племенной ценности в российской популяции КРС голштинской и черно-пестрой породы по признакам фертильности. Достоверность геномной оценки

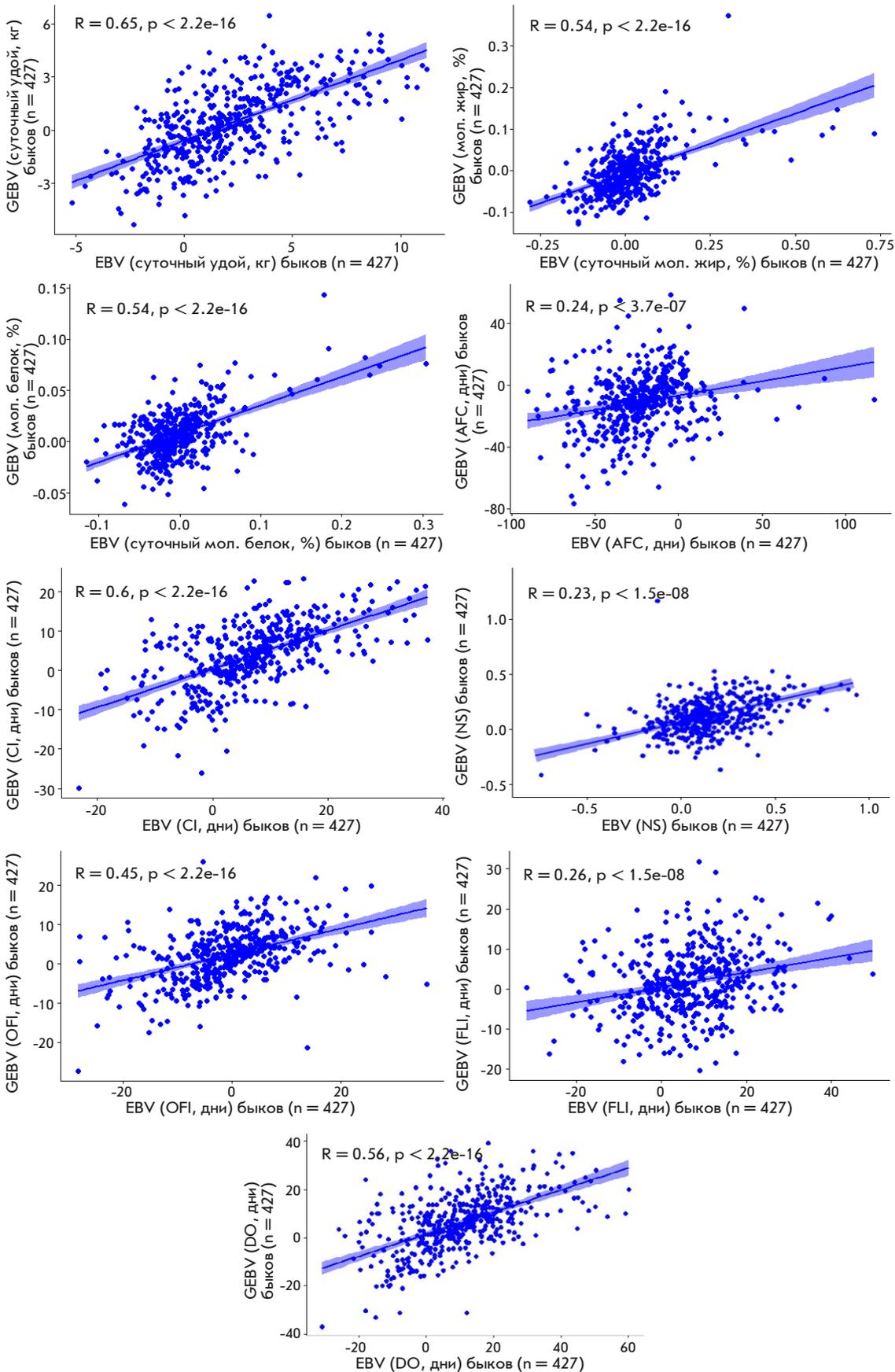


Рис. 4. Корреляция между значениями племенной ценности быков-производителей по потомству (EBV) и их племенной ценности по генотипу (GEBV) по признакам фертильности и молочной продуктивности

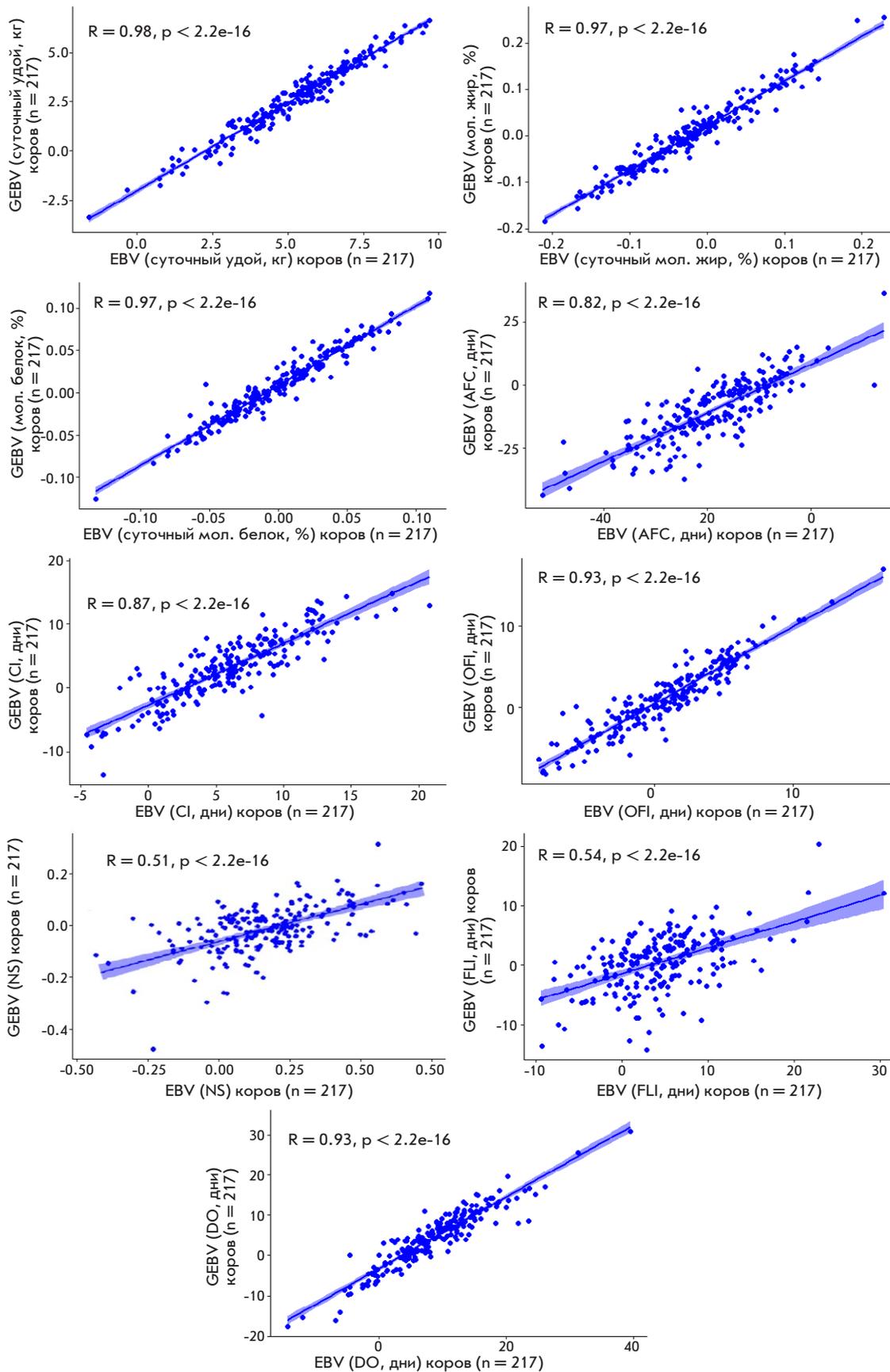


Рис. 5. Корреляция между значениями племенной ценности генотипированных коров по потомству (EBV) и их племенной ценности по генотипу (GEBV) по основным признакам фертильности и молочной продуктивности

Таблица 5. Сравнение черно-пестрой породы с разными породами КРС в мире

Порода	Количество коров		
	Удой, кг	Молочный жир	Молочный белок
Черно-пестрая	1047224	1033839	1046148
Nordic RDC	3538966	3538966	3538966
Голштинская (Канада)	5976711	5976711	5976711
Айрширская (Канада)	221533	221533	221533
Джерсейская (Канада)	185737	185737	185737
Португальская голштинская	578552	-	-
Немецкая голштинская	48977	-	-
	Количество тестовых дней, млн		
	Удой, кг	Молочный жир	Молочный белок
Черно-пестрая	29.7	26.4	27
Nordic RDC	95.6	95.6	95.6
Голштинская (Канада)	72.4	72.4	72.4
Айрширская (Канада)	2.4	2.4	2.4
Джерсейская (Канада)	1.7	1.7	1.7
Португальская голштинская	11.4	-	-
Немецкая голштинская	0.106	-	-
	Достоверность GEBV, %		
	Удой, кг	Молочный жир	Молочный белок
Черно-пестрая	65	54	54
Nordic RDC	40	50	40
Голштинская (Канада)	65	58	67
Айрширская (Канада)	39	43	54
Джерсейская (Канада)	58	62	68
Португальская голштинская	52–72	-	-
Немецкая голштинская	81–88	-	-

племенной ценности составила 65% по суточному удою и 54% по содержанию жира и белка в молоке. Для признаков фертильности достоверность GEBV составила: CI (60%), DO (56%), OFI (45%), AFC (24%), FLI (26%) и NS (23%). Эти значения немного больше, чем у нордического красно-молочного скота (от 0.22 до 0.31%) по трем признакам фертильности [31]. Сходный результат (достоверность 28.9%) установлен в работе Su и соавт. для оценки племенной ценности у датской джерси с использованием небольшой референсной популяции (1250 датских быков) [32].

Также для оценки племенной ценности КРС по молочным признакам мы использовали модель тестового дня TD ssGBLUP-AM. В настоящее время эта модель используется для официальной оценки племенной ценности КРС во многих странах, например, нордического красно-молочного скота (RDC) [33]. Официальные данные по оценке RDC за март 2012 года получены в ходе генетической оценки КРС северных стран (NAV). Для оценки племенной ценности RDC отобрано 3538966 коров с 95.6 млн записей тестовых дней, а общее число животных

в родословной RDC составило 477468 (табл. 5). Если сравнить результаты изучения голштинской молочной породы, которое мы провели ранее, то видно, что несмотря на почти 2.5-кратную разницу в размере статистической выборки, оценка племенной ценности голштинской и черно-пестрой породы методом TD ssGBLUP-AM имеет довольно высокую достоверность прогноза (порядка 65%).

Результат расчета достоверности геномного прогноза племенной ценности, проведенного нами, сопоставим с результатом оценки племенной ценности коров голштинской породы в Португалии [34]. Среднее значение достоверности геномной оценки племенной ценности португальских голштинских быков-производителей составило 52% у молодых быков и 72% у быков, имеющих данные по продуктивности их дочерей.

Модель тестового дня также используется для геномной оценки племенной ценности трех молочных популяций КРС в Канаде (голлштинская, айрширская и джерсейская). Достоверность прогноза племенной ценности по молочному удою составила 65, 39, 58% у голштинской, айрширской и джерсейской поро-

ды соответственно [35]. В работе Bohlouli и соавт. для оценки племенной ценности 48977 голштинских коров в Германии использовали 11.4 млн записей тестовых дней. Достоверность оценки достигала 88% [36].

ВЫВОДЫ

В нашем исследовании, несмотря на небольшое число быков-производителей в референсной популяции, генотипирование которых проводили, показана приемлемая достоверность геномной оценки племенной ценности КРС. Достоверность может быть повышена за счет увеличения числа генотипированных животных в референсной популяции. Нами показана возможность применения геномной оценки племенной ценности у отечественного поголовья КРС голштинской и черно-пестрой породы

по различным признакам фертильности и молочной продуктивности. Данная система позволит вывести отечественную племенную работу на современный конкурентоспособный уровень и уже при рождении оценивать племенную ценность КРС на основании информации о геноме животного. ●

Работа ФШ и ЕП частично поддержана РФФИ (грант № 17-29-08033) и частично Минобрнауки России (государственное задание ФИЦ Биотехнологии РАН). Работа АХ частично поддержана Минобрнауки России в рамках реализации проекта по Соглашению № 14.579.21.0147 о предоставлении субсидии (уникальный идентификатор работ (проекта) RFMEFI57917X0147) и частично поддержана РФФИ (грант № 17-29-08033).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лукьянов К., Солошенко В.А., Клименок И.И., Юдин Н.С. // Генетика и разведение животных. 2015. № 3. С. 63–69.
2. Танана Л.А., Минина Н.Г., Климов Н.Н., Коршун С.И., Пешко В.В. Основы разведения сельскохозяйственных животных: Учебное пособие для студентов факультета повышения квалификации и переподготовки кадров. ГГАУ, Гродно, 2011. 116 с.
3. Hayes B.J., Bowman P.J., Chamberlain A.J., Goddard M.E. // J. Dairy Sci. 2009. V. 92. № 2. P. 433–443.
4. Кузнецов В. // Проблемы биологии продуктивных животных. 2012. № 4. С. 18–57.
5. Pribyl J., Rehout V., Citek J., Pribylova J. // J. Sci. Food Agric. 2010. V. 90. № 11. P. 1765–1773.
6. Robinson G.K. // Statistical Sci. 1991. P. 15–32.
7. Ma L., Cole J., Da Y., VanRaden P. // J. Dairy Sci. 2019. V. 102. № 4. P. 3735–3743.
8. Pryce J., Daetwyler H. // Animal Production Sci. 2011. V. 52. № 3. P. 107–114.
9. Schaeffer L., Jamrozik J., Kistemaker G., van Doormaal J. // J. Dairy Sci. 2000. V. 83. № 5. P. 1135–1144.
10. Jamrozik J., Schaeffer L., Dekkers J. // J. Dairy Sci. 1997. V. 80. № 6. P. 1217–1226.
11. Wiggans G., Goddard M. // J. Dairy Sci. 1997. V. 80. № 8. P. 1795–1800.
12. Meseret S., Tamir B., Gebreyohannes G., Lidauer M., Negussie E. // Asian-Australasian J. Animal Sci. 2015. V. 28. № 9. P. 1226.
13. Van Tassell C.P., Quaas R.L., Everett R.W. // Dairy Sci. 1992. Suppl 1. P. 251.
14. Ptak E., Schaeffer L. // Livestock Production Sci. 1993. V. 34. P. 23–34.
15. Swalve H. // Archiv für Tierzucht. 1995.
16. Нардин Д.С., Малинина А.И. // Электронный научно-методический журнал Омского ГАУ. 2015. № 3.
17. Ивченко Г.И., Медведев Ю.И. Введение в математическую статистику. М.: Изд-во ЛКИ, 2010. 600 с.
18. Артурович Л. Правила оценки молочной продуктивности коров молочно-мясных пород. М.: Минсельхозпрод России, 1997. <https://pandia.ru/text/80/359/17492.php>
19. Wood P. // Nature. 1967. V. 216. № 5111. P. 164–165.
20. Wilmink J. // Livestock Production Sci. 1987. V. 16. № 4. P. 335–348.
21. https://queries.uscdcb.com/eval/summary/inbrd.cfm?R_Menu=HO#StartBody
22. Hastie T., Tibshirani R., Friedman J. // Springer. 2001. P. 236–243.
23. Koivula M., Strandén I., Pösö J., Aamand G., Mäntysaari E. // J. Dairy Sci. 2015. V. 98. № 4. P. 2775–2784.
24. Oliveira H., Lourenco D., Masuda Y., Misztal I., Tsuruta S., Jamrozik J., Brito L., Silva F., Schenkel F. // J. Dairy Sci. 2019. V. 102. № 3. P. 2365–2377.
25. Кузнецов В. // Актуальные проблемы производства свинины в Российской Федерации. Материалы 19-го заседания межвузовского координационного совета по свиноводству и международной научно-производственной конференции. ДГАУ. 2010. С. 50–57.
26. Ayalew A., Aliy M., Negussie E. // Asian-Australasian J. Animal Sci. 2017. V. 30. № 11. P. 1550.
27. Misztal I., Tsuruta S., Strabel T., Auvray B., Druet T., Lee D. // Proc. 7th world congress on genetics applied to livestock production. 2002. V. 28. № 7.
28. Patry C., Ducrocq V. // Genet. Sel. Evol. 2011. V. 43. № 1. P. 1–9.
29. Lourenco D., Misztal I., Wang H., Aguilar I., Tsuruta S., Bertrand J. // J. Anim. Sci. 2013. V. 91. № 9. P. 4090–4098.
30. Naserkheil M., Lee D.H., Mehrban H. // BMC Genet. 2020. V. 21. № 1. P. 1–9.
31. Matilainen K., Strandén I., Aamand G.P., Mäntysaari E.A. // J. Anim. Breed. Genet. 2018. V. 135. № 5. P. 337–348.
32. Su G., Ma P., Nielsen U., Aamand G., Wiggans G., Guldbbrandtsen B., Lund M. // Animal. 2016. V. 10. № 6. P. 1067–1075.
33. Koivula M., Strandén I., Pösö J., Aamand G.P., Mäntysaari E.A. // Interbull Bulletin. 2012. № 46. P. 115–120.
34. Silva A., Silva D., Silva F., Costa C., Lopes P., Caetano A., Thompson G., Carvalheira J. // J. Dairy Sci. 2019. V. 102. № 7. P. 6330–6339.
35. Oliveira H., Lourenco D., Masuda Y., Misztal I., Tsuruta S., Jamrozik J., Brito L., Silva F., Schenkel F. // J. Dairy Sci. 2019. V. 102. № 3. P. 2365–2377.
36. Bohlouli M., Alijani S., Naderi S., Yin T., König S. // J. Dairy Sci. 2019. V. 102. № 1. P. 488–502.

ПРИЛОЖЕНИЕ

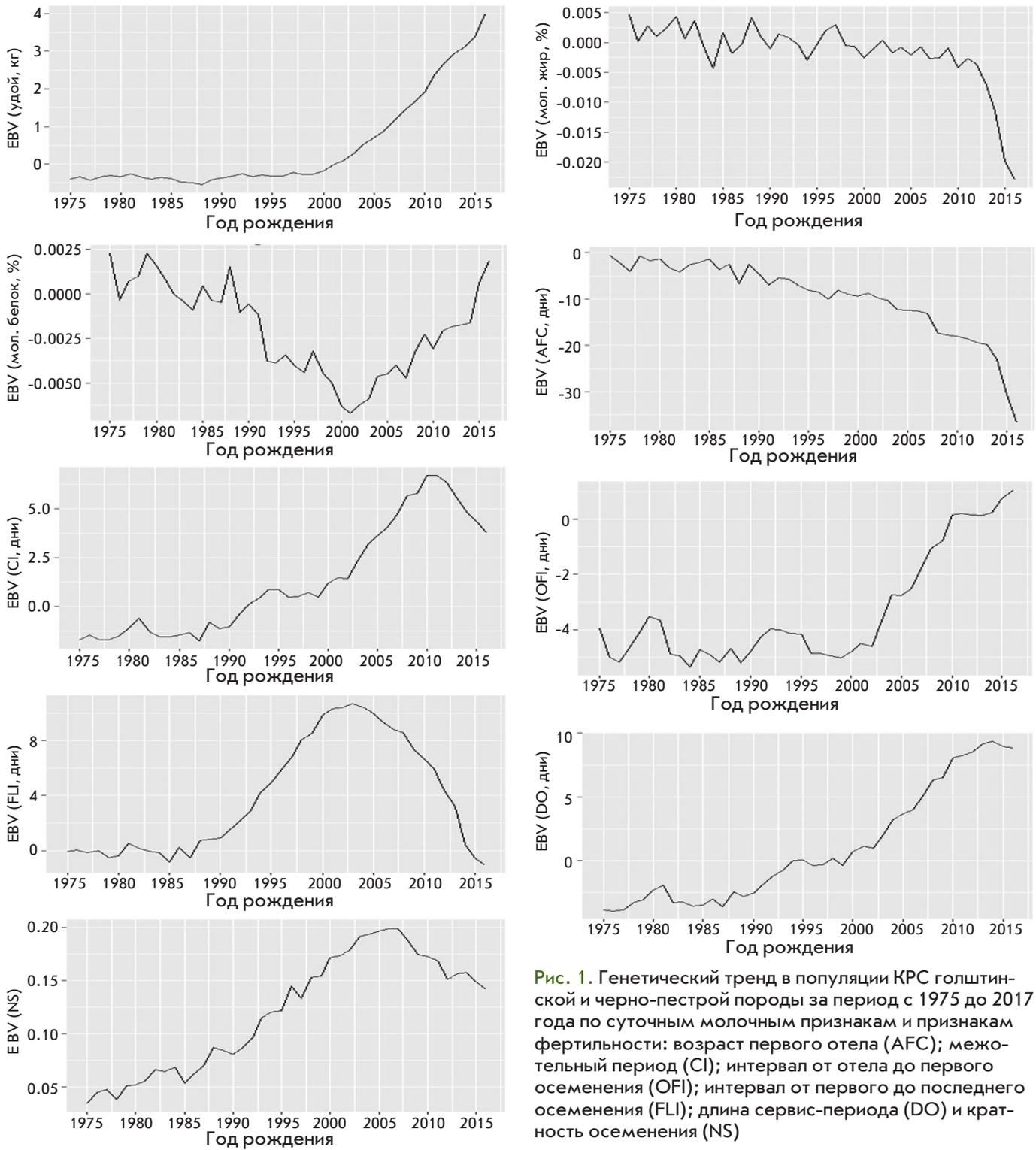


Рис. 1. Генетический тренд в популяции КРС голштинской и черно-пестрой породы за период с 1975 до 2017 года по суточным молочным признакам и признакам фертильности: возраст первого отела (АФС); межотельный период (CI); интервал от отела до первого осеменения (OFI); интервал от первого до последнего осеменения (FLI); длина сервис-периода (DO) и кратность осеменения (NS)

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Журнал *Acta Naturae* публикует экспериментальные и обзорные статьи, посвященные наиболее актуальным вопросам фундаментальных и прикладных наук о живом и биотехнологий. Журнал выпускается на русском и английском языках. Журнал *Acta Naturae* входит в Перечень ведущих периодических изданий Высшей аттестационной комиссии Минобрнауки России, включен в базы данных PubMed, Web of Science, Scopus, РИНЦ.

Редакция журнала *Acta Naturae* просит авторов руководствоваться приведенными ниже правилами. Статьи, не соответствующие профилю журнала или не соответствующие его требованиям, отклоняются Редакционным советом и Редколлегией без рецензирования. Редакция не рассматривает работы, результаты которых уже были опубликованы или находятся на рассмотрении в других изданиях.

Максимальный объем обзора вместе с таблицами и списком литературы не должен превышать 50 000 знаков с пробелами (примерно 30 страниц формата А4, напечатанных через 1.5 интервала, шрифт Times New Roman, 12 размер) и 16 рисунков.

Объем экспериментальной статьи не должен превышать 30 000 знаков с пробелами (примерно 15 страниц формата А4 вместе с таблицами и списком литературы). Число рисунков не должно превышать 10.

Новые, приоритетные данные, требующие срочного опубликования, могут быть напечатаны в разделе «Краткие сообщения». Краткое сообщение должно содержать постановку задачи, экспериментальный материал и выводы. Объем краткого сообщения не должен превышать 12 000 знаков (5–6 страниц формата А4 вместе с таблицами и списком литературы не больше 12 источников). Число рисунков не должно превышать трех.

Рукопись и все необходимые файлы следует загрузить на сайт www.actanaturae.ru:

- 1) текст в формате Word 2003 for Windows;
- 2) рисунки в формате TIFF;
- 3) текст статьи с рисунками в едином pdf-файле;
- 4) перевод на английский язык названия статьи, фамилий и инициалов авторов, названий организаций, реферата, ключевых слов, сокращений, подписей к рисункам, русскоязычных ссылок;
- 5) сопроводительное письмо, в котором надо указать, что представленный материал ранее нигде не был опубликован и не находится на рассмотрении на предмет публикации в других изданиях;
- 6) лицензионный договор (форму договора можно скачать с сайта www.actanaturae.ru).

ОФОРМЛЕНИЕ РУКОПИСЕЙ

Рукопись должна быть построена следующим образом:

- УДК в левом верхнем углу. Шрифт – курсив, размер 9.
- Название статьи. Шрифт – полужирный. Заглавие не должно быть слишком длинным или коротким и малоинформативным. Оно должно отражать главный результат, суть и новизну работы. Название не должно превышать 100 знаков.
- Инициалы и фамилии авторов (в обзорах не более 5 авторов).

- Указывается электронный адрес автора, ответственного за переписку с редакцией, включая работу с корректурой. Автор, ответственный за переписку, выделяется значком *.
- Приводится полное название научной организации и ее ведомственная принадлежность. Если научных учреждений два и более, необходимо цифровыми надстрочными индексами связать название учреждения и фамилии авторов, в нем работающих.
- Реферат. Структура реферата должна быть четкой и отражать следующее: постановка проблемы, описание экспериментальных методов, возможность практических приложений, возможность постановки новых задач. Средний объем реферата составляет 20 строк (примерно 1500 знаков).
- Ключевые слова (3–6). В них следует отразить: предмет исследования, метод, объект, специфику данной работы.
- Список сокращений.
- Введение.
- Раздел «Экспериментальная часть».
- Раздел «Результаты».
- Раздел «Обсуждение» (или «Результаты и обсуждение»).
- Раздел «Выводы» (или «Заключение»). В конце раздела указываются названия организаций, финансировавших работу, в скобках – номера грантов.
- Раздел «Список литературы».

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО НАБОРУ И ОФОРМЛЕНИЮ ТЕКСТА

- Рекомендуется использование редактора Microsoft Word 2003 for Windows.
- Шрифт – Times New Roman. Стандартный размер шрифта – 12.
- Интервал между строками 1.5.
- Нецелесообразно использовать более одного пробела между словами.
- Запрещено использовать при наборе текста автоматическое создание сносок, автоматический перенос или автоматический запрет переносов, создание списков, автоматический отступ и т.п.
- При создании таблицы рекомендуется использовать возможности Word (Таблица – Добавить таблицу) или MS Excel. Таблицы, набранные вручную (с помощью большого числа пробелов, не используя ячейки), не могут быть использованы.
- Между инициалами и фамилией всегда ставится пробел: А.А. Иванов (кроме перечисления авторов в заглавии статьи, где пробелы ставятся и между инициалами – А. А. Иванов).
- Все даты в виде «число.месяц.год» набиваются следующим образом: 02.05.1991.
- Точка не ставится после: УДК, заглавия статьи, авторов, адресов, заголовков и подзаголовков, названий таблиц, подписей к рисункам, размерностей (с – секунда, г – грамм, мин – минута, ч – час, сут – сутки, град – градус).
- Точка ставится после: сносок (в том числе в таблицах), примечаний к таблице, краткой аннотации, сокращений (мес. – месяц, г. – год, т. пл. – температура плавления), но не ставится в подстрочных индексах: $T_{\text{пл}}$ – температура плавления, $T_{\text{ф.п}}$ – температура фазового перехода. Исключение: млн – миллион – без точки.

- Десятичные цифры набираются только через точку, а не через запятую (0.25 вместо 0,25).
- Сокращения единиц измерений пишутся только русскими буквами (мкМ, но не μM ; нм, но не nm).
- Знак «–» (тире) отбивается пробелами, знаки «минус», «интервал» или «химическая связь» пробелами не отбиваются.
- В качестве знака умножения используется только « \times ». Знак « \times » ставится только в том случае, если справа от него стоит число. Символом « \cdot » обозначаются комплексные соединения в химических формулах, а также нековалентные комплексы (ДНК:РНК и т.п.).
- Используются только «кавычки», но не “кавычки”.
- В формулах используются буквы латинского и греческого алфавитов.
- Латинские названия родов и видов животного мира пишутся курсивом, таксонов более высокого ранга, а также названия вирусов и бактериофагов в латинской транскрипции – прямым шрифтом.
- Названия генов (кроме обозначения генов дрожжей) пишутся строчным курсивом, названия белков – прямым шрифтом.
- Названия нуклеотидов (A, T, G, C, U), аминокислотных остатков (Arg, Ile, Val и т.д.) и фосфатов (ATP, AMP и т.д.) пишутся в латинской транскрипции прямым шрифтом.
- Нумерация азотистых оснований и аминокислотных остатков пишется без дефиса (T34, Ala89).
- При выборе единиц измерения необходимо придерживаться международной системы единиц СИ.
- Молекулярная масса выражается в дальтонах (Да, кДа, МДа).
- Количество пар нуклеотидов обозначается сокращениями (п.н., т.п.н.).
- Количество аминокислотных остатков обозначается сокращением (а.о.).
- Биохимические термины (в частности, названия ферментов) приводятся в соответствии с международными правилами IUPAC.
- Сокращения терминов и названий в тексте должны быть сведены к минимуму.
- Повторение одних и тех же данных в тексте, таблицах и графиках недопустимо.

ТРЕБОВАНИЯ К ИЛЛЮСТРАЦИЯМ

- Рисунки к статьям приводятся отдельными файлами в формате TIFF, при необходимости – в заархивированном виде.
- Иллюстрации должны иметь разрешение не ниже 300 dpi для цветных и полутоновых изображений и не менее 600 dpi для черно-белых иллюстраций.
- Недопустимо использование дополнительных слоев.

РЕЦЕНЗИРОВАНИЕ, ПОДГОТОВКА РУКОПИСИ К ПЕЧАТИ, ОЧЕРЕДНОСТЬ ПУБЛИКАЦИИ

Статьи публикуются по мере поступления. Члены редколлегии имеют право рекомендовать к ускоренной публикации статьи, отнесенные редколлегией к приоритетным и получившие высокую оценку рецензентов.

Статьи, поступившие в редакцию, проходят экспертизу членов редколлегии и направляются на внешнее рецензирование. Выбор рецензента является прерогативой ре-

дакции. Рукопись направляется на отзыв специалистам в данной области исследований, и по результатам рецензирования редколлегией определяется дальнейшая судьба рукописи: принятие к публикации в представленном виде, необходимость доработки или отклонение.

Возвращение рукописи авторам на доработку не означает, что статья принята к печати. После получения доработанного текста рукопись вновь рассматривается редколлегией. Доработанный текст автор должен вернуть вместе с ответами на все замечания рецензента.

Переработанная рукопись должна быть возвращена в редакцию в течение одной недели после получения авторами отзывов.

На всех стадиях работы с авторами, редакторами и рецензентами редакция использует электронно-почтовую связь, поэтому авторы должны быть очень внимательны к указанному в рукописи электронному адресу и должны своевременно сообщать о произошедших изменениях.

Корректуры статей редакция рассылает авторам по электронной почте в виде pdf-файла. На стадии корректуры не допускаются замены текста, рисунков или таблиц. Если это все же необходимо, то данный вопрос решается с редколлегией.

ОФОРМЛЕНИЕ ССЫЛОК

Ссылки на цитируемую литературу приводятся в тексте цифрами в квадратных скобках (нумерация в порядке цитирования). Ссылке на работу в таблице или в подписи к рисунку присваивается порядковый номер, соответствующий расположению данного материала в тексте статьи.

Для книг: фамилия и инициалы автора, полное название книги, место издания, издательство, год издания, том или выпуск и общее количество страниц.

Кулаев И.С., Вагабов В.М., Кулаковская Т.В. Высокомолекулярные неорганические полифосфаты: биохимия, клеточная биология, биотехнология. М.: Научный мир, 2005. 216 с.

Ссылки на книги, переведенные на русский язык, должны сопровождаться ссылками на оригинальные издания с указанием выходных данных.

Для периодических изданий: фамилия и инициалы автора, название журнала, год издания, том, номер, первая и последняя страницы статьи. Указываются фамилии первых 10 авторов, например:

Ross M.T., Grafham D.V., Coffey A.J., Scherer S., McLay K., Muzny D., Platzer M., Howell G.R., Burrows C., Bird C.P., et al. // Nature. 2005. V. 434. № 7031. P. 325–337.

Ссылки на *авторефераты* диссертаций должны содержать фамилию и инициалы автора, название диссертации, место выполнения работы, год защиты диссертации.

Шкурников М.Ю. Влияние нагрузок различной интенсивности на концентрацию белка теплового шока с молекулярной массой 70 кДа. Дис. ... канд. мед. наук. М.: ФГУ ВНИИФК, 2009.

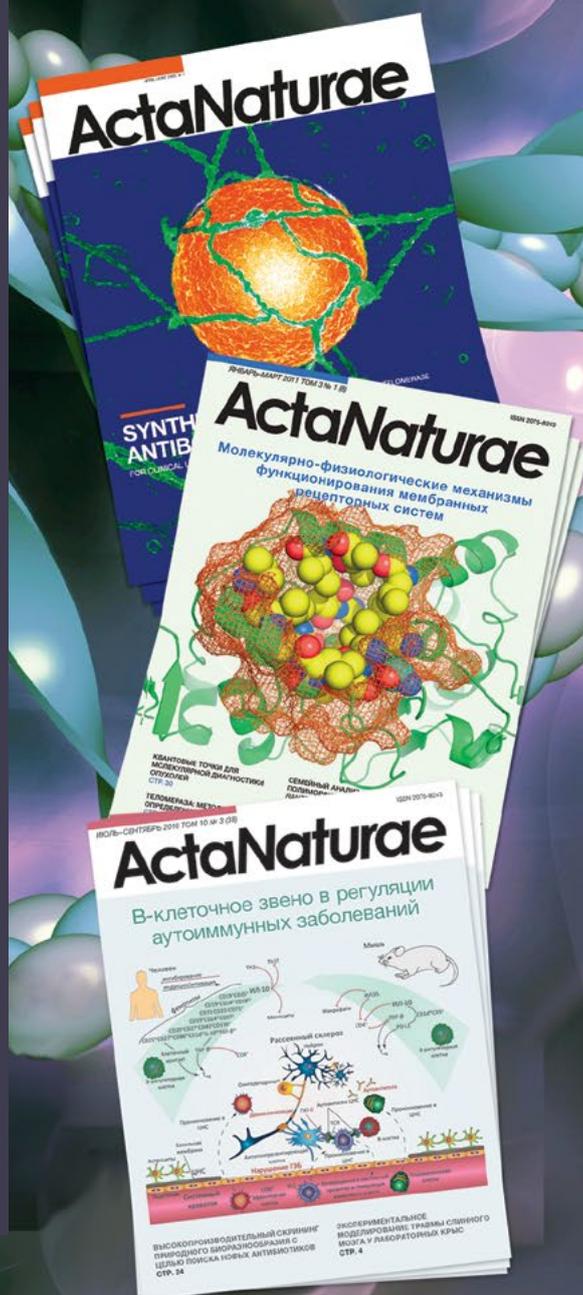
Ссылки на *патенты* должны содержать фамилии и инициалы авторов, вид патентного документа (авторское свидетельство или патент), номер, название страны, выдавшей документ, индекс международной классификации изобретений, год выдачи патента.

Для связи с редакцией следует использовать следующий электронный адрес: actanaturae@gmail.com, телефон: (495) 727-38-60.

ActaNaturae

Журнал *Acta Naturae* уделяет особое внимание междисциплинарному характеру исследований и разработок, которые находятся на стыке различных сфер биологических специальностей – молекулярной биологии, биохимии, молекулярной генетики и биологической медицины.

Журнал *Acta Naturae* выпускается на русском и английском языках, входит в Перечень ведущих периодических изданий Высшей аттестационной комиссии Минобрнауки России, включен в базы данных РИНЦ, PubMed, Web of Science, Scopus.



ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ АВТОРОВ

Для связи с редакцией используйте электронный адрес actanaturae@gmail.com и телефон (495) 727-38-60.

Рукопись и все необходимые файлы загружайте на сайт www.actanaturae.ru.

