

# Acta Naturae

---

## НЕПРИРОДНЫЕ АНТИТЕЛА

ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

РЕГУЛЯЦИЯ ТЕЛОМЕРАЗЫ  
В ОНКОГЕНЕЗЕ

СТР. 51

СТРУКТУРА  
МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА  
ВОЗБУДИТЕЛЯ ОПИСТОРХОЗА

СТР. 99

СТЭКИНГ-ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ  
В КОМПЛЕКСАХ БЕЛКОВ  
С АДЕНИН- И ГУАНИН-  
СОДЕРЖАЩИМИ ЛИГАНДАМИ

СТР. 124

«ЖИВЫЕ СИСТЕМЫ»:  
НАУЧНЫЕ И ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ  
ПРИОРИТЕТЫ

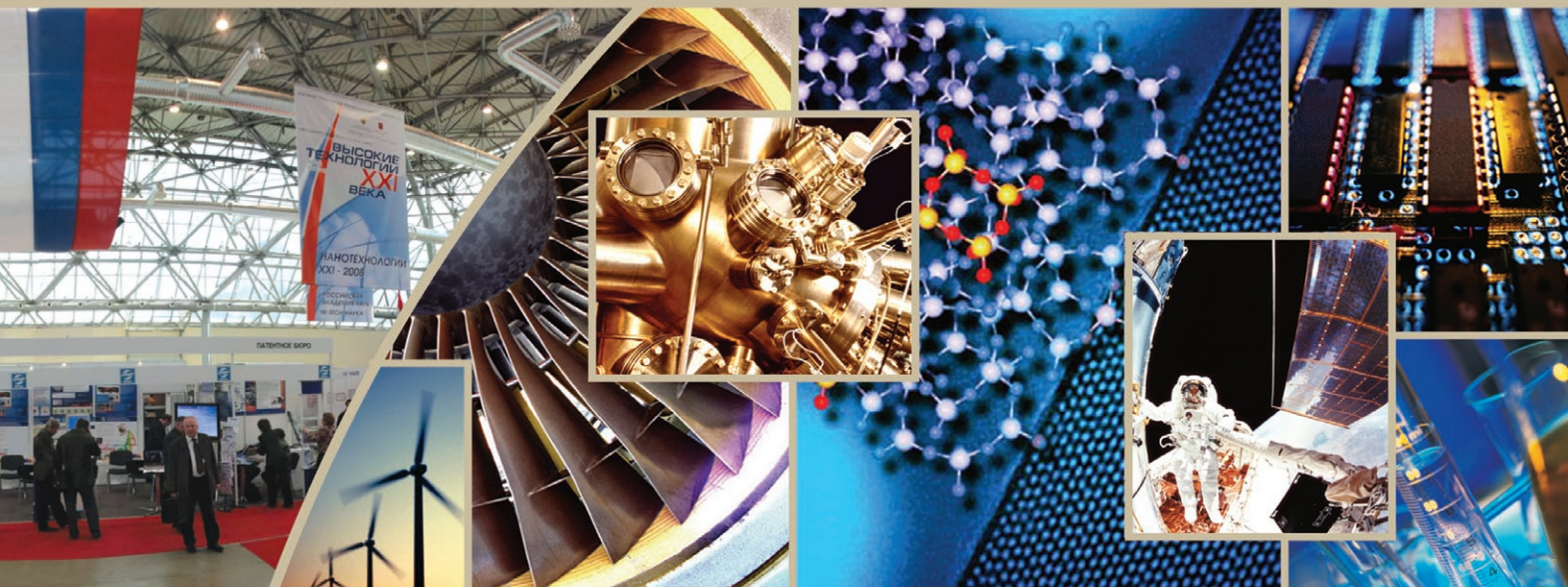
СТР. 19

**Миссия Форума** - содействие развитию инновационных процессов в России, международного научно-технического и делового сотрудничества.

Форум является одним из крупнейших мероприятий инновационной направленности в России. Ежегодно в Форуме участвуют более 500 компаний из 40 регионов РФ и 20 стран ближнего и дальнего зарубежья.



**21-24 апреля 2009 года**  
Россия, Москва, ЦВК «ЭКСПОЦЕНТР»



# 10 ЮБИЛЕЙНЫЙ МЕЖДУНАРОДНЫЙ ФОРУМ И ВЫСТАВКА **ВЫСОКИЕ ТЕХНОЛОГИИ** HIGH TECHNOLOGY OF **XXI** **ВЕКА**

**Организаторы:**

Министерство промышленности и торговли Российской Федерации  
Департамент науки и промышленной политики города Москвы  
Институт экономики и комплексных проблем связи ОАО «ЭККОС»  
Российский фонд развития высоких технологий  
Московская торгово-промышленная палата  
Московская ассоциация предпринимателей  
Министерство промышленности и науки Московской области  
ЗАО «Экспоцентр»

**Под патронатом**

Торгово-промышленной палаты Российской Федерации

**Устроитель - ООО «ЭКСПО-ЭККОС»**

тел.: + 7 (495) 332-35-95, 332-36-01, 331-23-33  
e-mail: vt21@vt21.ru

**www.vt21.ru**

Приглашаем принять участие в мероприятиях Форума:

■ **10-я МЕЖДУНАРОДНАЯ ВЫСТАВКА «ВЫСОКИЕ ТЕХНОЛОГИИ XXI ВЕКА»**

**Тематика экспозиции:**

нанотехнологии и новые материалы  
биотехнологии и медицина  
энергетика и экология  
авиационно-космические технологии  
телекоммуникационные системы  
информационные технологии  
радиоэлектроника  
лазерные технологии  
машиностроение

**Выставочные салоны:**

«Hi-Tech-МЕГАПОЛИС»  
«НАУКОГРАД»  
«ТЕХНОПАРК»  
«Hi-Tech-НАУКА»

**Специализированные выставки:**

«НАНОТЕХНОЛОГИИ XXI – 2009»  
«ЭНЕРГИЯ XXI – 2009»  
«НЕОГЕОГРАФИЯ XXI – 2009»

■ **МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ «ВЫСОКИЕ ТЕХНОЛОГИИ – СТРАТЕГИЯ XXI ВЕКА»**

■ **КОНКУРСНАЯ ПРОГРАММА**

■ **БИЗНЕС-КЛУБ**

■ **ПРЕЗЕНТАЦИИ**



ТПП РФ



# Дорогие читатели журнала «Acta Naturae»!

**П**редставляем вам первый номер нового издания, в котором дан широкий спектр проблем, связанных с «науками о жизни». Можно задаться вопросом, зачем нужен очередной журнал подобной проблематики. Современные возможности интернета позволяют нам убедиться в наличии сотен изданий с существенно различающимися значениями «импакт-факторов» в области биомедицинской науки. Имеются весьма уважаемые солидные издания с многолетней историей. Есть и новички, быстро пробившие себе дорогу к читателю. Ежегодно число таких изданий увеличивается. Найти свою нишу и подчеркнуть оригинальность не просто. Тем не менее, мы приняли решение издавать *отечественный журнал* в двуязычном формате (в русском и английском вариантах) и надеемся, что нам удастся заинтересовать читателей. Наша надежда базируется на возможном интересе отечественного и зарубежного читателя к последним достижениям наиболее продвинутых лабораторий и научных центров России. Эти сведения на основе «peer review» мы планируем давать в виде кратких журнальных сообщений. Несмотря на многие пессимистические прогнозы, Российская наука выжила в тяжелые кризисные 90-е годы, и в последние 3-4 года во многих университетских и академических центрах наметился определенный положительный рост. Во многом этому способствовало увеличение финансирования отечественных фондов и определенные кадровые решения.

Второй важной составляющей нового издания будут обзоры приглашенных иностранных и отечественных авторов по актуальным проблемам биомедицинской науки. Мы думаем, что эти разделы будут интересны как для молодежной студенческой аудитории, так и для состоявшихся исследователей. Мы не хотим также оставаться в стороне от социальных и организационных аспектов развития науки. В этой связи с этим мы планируем публиковать интервью с ведущими учеными, представителями бизнеса, заинтересованными в наукоемком производстве, чиновниками. Возможно, нам удастся создать трибуну для дискуссии по актуальным аспектам развития наук о жизни и в целом научной деятельности в России. Мы отдаем себе отчет, что «наука о живом» тесно переплетена с прикладными аспектами биофармацевтики и, возможно, недостаточная информированность отечественных исследователей в этой области будет восполнена усилиями настоящего издания. Крайне заманчиво видеть среди авторов нового издания представителей отечественного и зарубежного бизнеса в области «биофармы». В случае успеха мы надеемся, что на страницах «Acta Naturae» появятся и экспериментальные статьи зарубежных авторов, и издание приобретет международный характер.

Желаем всем читателям нового издания успехов в их научных исследованиях, практической работе и приглашаем к сотрудничеству.

**Редакционная коллегия**

# Уважаемые коллеги!

От имени Федерального агентства по науке и инновациям России хочу поздравить всех нас с выходом первого номера журнала «Acta Naturae». Это принципиально новый, не имеющий в нашей стране полных аналогов журнал.

Интерес современного постиндустриального мира прикован к областям знания, связанным как с фундаментальными проблемами биологических наук, так и с прикладными аспектами биологии. Биотехнологии не только становятся приоритетом развития науки, но и являются одним из драйверов интенсивного роста новых секторов экономик ведущих стран мира. Прикладные задачи, решаемые с помощью биотехнологий, имеют отношение к обеспечению интересов отдельных отраслей промышленности и – в более широком смысле – обеспечивают государственную безопасность.

Одним из важнейших приоритетов научно-технического развития нашей страны является направление «Живые системы». Прогресс в данной области государство обоснованно считает главной своей задачей как с точки зрения развития наукоемких и конкурентных отраслей экономики, так и с точки зрения поддержания надлежащего уровня безопасности. Работа в данном приоритетном направлении активно поддерживается в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы».

Приоритетное направление «Живые системы» является вторым по объемам финансирования в рамках ФЦП (по сравнению с приоритетным направлением «Индустрия наносистем и наноматериалов»). Мы считаем, что, с точки зрения государственных интересов, данное направление должно занимать лидирующее положение в связи с ярко выраженной социальной направленностью. Именно продукция биотехнологий оказывает основное влияние на качество жизни населения.

Вкратце остановимся на некоторых показателях, иллюстрирующих деятельность Федерального агентства по науке и инновациям в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы» по приоритетному направлению «Живые системы».

В настоящее время в рамках направления «Живые системы» выполняются работы по 299 государственным контрактам (всего в рамках ФЦП по семи приоритетным направлениям ведутся работы по 1361 контракту), общее число организаций, исполняющих контракты по направлению «Живые системы» в качестве головных организаций или соисполнителей, – 403 (всего в рамках ФЦП – 1391). На формирование тематики было подано 939 заявок (всего – 3180), число поданных заявок на конкурс – 396 (всего – 1957). В конкурсах в рамках приоритетного направления «Живые системы» приняли участие организации 23 ведомств, из которых организации 17 ведомств оказались победителями конкурсов.

Что касается финансирования работ по данному приоритетному направлению, то в период с 2005 по 2008 гг.

объемы освоенных бюджетных средств выросли почти втрое, с 1168.7 до 3242.6 млн рублей (23.5 % от общего объема финансирования работ по ФЦП).

Одним из факторов, способствующих интенсивному развитию биотехнологий, является междисциплинарный характер работ, выполняемых в этой области. В них задействованы не только биологи, но и специалисты из самых разных секторов науки, в частности, физики, химики.

Итак, речь идет о старте уникального издания, способствующего налаживанию контактов между представителями разных областей науки. Кроме того, поскольку работы по приоритетному направлению «Живые системы» ведутся в организациях различной ведомственной принадлежности, мы надеемся увидеть новый журнал в качестве своеобразной межведомственной информационной площадки, представляющей интерес для научных организаций, инвесторов, федеральных ведомств, разрабатывающих государственную инновационную политику в профильных отраслях.

Мы надеемся, что журнал «Acta Naturae» будет полезен не только представителям фундаментальной науки, но и специалистам прикладной направленности. Наверное, прикладная наука будет представлена даже шире, поскольку речь идет о технологиях. Соответственно, в структуре публикуемых в журнале материалов мы бы хотели видеть как можно больше результатов работ, имеющих ярко выраженную практическую направленность. На наш взгляд, важными составляющими информационной политики журнала должны стать аналитические отраслевые обзоры, посвященные перспективам развития той или иной области живых систем, их состоянию в России и мире, механизмам коммерциализации продукции, полученной в ходе работ по приоритетному направлению «Живые системы». Это важно с точки зрения расширения интереса инвесторов к данному приоритетному направлению.

В заключение хочется пожелать журналу «Acta Naturae» занять свою уникальную нишу в ряду ныне существующих периодических изданий в области наук и технологий и способствовать выходу российских биотехнологий на качественно новый уровень, позволяющий им стать одной из основ будущей инновационной экономики России.



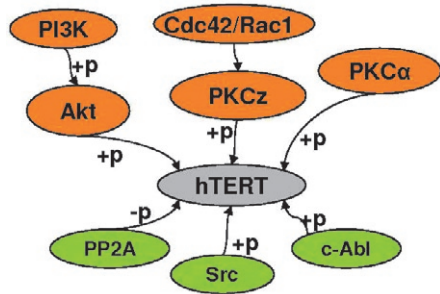
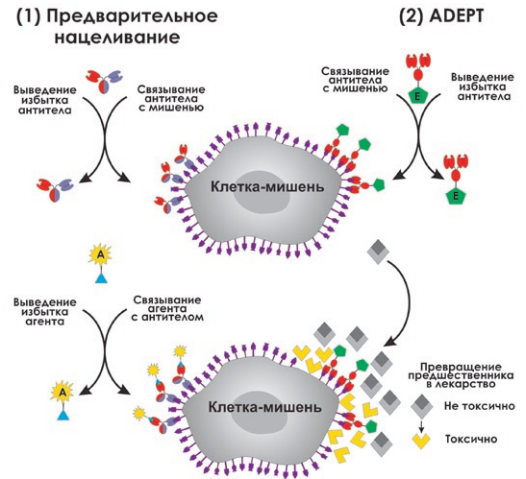
Инна Биленкина: «Биотехнологии являются одним из драйверов интенсивного роста новых спектров экономик ведущих стран мира»

**Инна Петровна Биленкина,**  
заместитель руководителя  
Федерального агентства по науке  
и инновациям России.

С. М. Деев, Е. Н. Лебедеко

# Современные технологии создания неприродных антител для клинического применения

Схема двухстадийных технологий поражения мишеней. Предварительное нацеливание (англ. pre-targeting) с помощью антител с последующим поражением мишени привлеченным агентом А. Предварительная доставка к мишени специального фермента E, который на второй стадии превращает неактивный предшественник лекарственного средства в активную форму - ADEPT (англ. - Antibody-Directed, Enzyme Pro-drug Therapy).



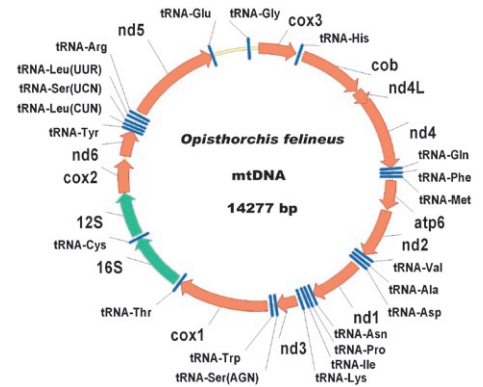
Д. А. Скворцов, М. П. Рубцова, М. Э. Зверева, Ф. Л. Киселев, О. А. Донцова

# Регуляция теломеразы в онкогенезе

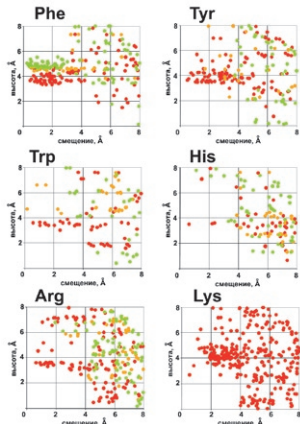
Регуляция активности белка hTERT с помощью фосфорилирования/дефосфорилирования. Активаторы показаны оранжевым, ингибиторы зеленым. "+p" – фосфорилирование, "-p" – дефосфорилирование.

В. А. Мордвинов, А. В. Марданов, Н. В. Равин, С. В. Шеховцов, С. А. Демаков, А. В. Катохин, Н. А. Колчанов, К. Г. Скрыбин

# Определение полной нуклеотидной последовательности митохондриального генома возбудителя описторхоза *Opisthorchis felineus*



Генетическая карта митохондриального генома *O.felineus*



Т. В. Пырков, Д. В. Пыркова, Е. Д. Балицкая, Р. Г. Ефремов

# Роль стэкинг-взаимодействий в комплексах белков с аденин- и гуанинсодержащими лигандами

Распределение центров ароматических колец и положительно заряженных боковых групп аминокислотных остатков белка-рецептора относительно центра гуанинового основания в комплексах белков с гуанинсодержащими лигандами. Красный цвет соответствует  $\cos^2\alpha = 0.6-1.0$  (параллельное расположение), зеленый –  $\cos^2\alpha = 0.0-0.4$  (перпендикулярное расположение), желтый – промежуточным значениям, где  $\alpha$  – угол между плоскостями ароматических циклов. Для Lys угол  $\alpha$  не определен.

## Учредители:

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

## Редакционный совет:

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

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

## Редакционная коллегия:

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

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

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

*Руководитель проекта:* Р.Р. Петров  
*Выпускающий редактор:* В.В. Сычев

*Подготовка иллюстраций и верстка:* К.К. Опарин  
*Корректурa:* Я.Н. Суханова  
*Дизайн-проект:* Х. Шнайдер

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

При перепечатке материалов ссылка на журнал  
«Acta Naturae» обязательна. Любое воспроизведение  
опубликованных материалов без письменного  
согласия редакции не допускается.

Редакция не несет ответственность за достоверность  
информации, опубликованной в рекламных материалах.

© ACTA NATURAE, 2009

Номер подписан в печать 3 июня 2009 г.  
Тираж 800 экз. Цена свободная.  
Отпечатано по заказу ПА «Real Profit Media»  
в типографии ООО «МегаПринт»

# СОДЕРЖАНИЕ

Дорогие читатели первого номера журнала  
*Acta Naturae!* ..... 1

Уважаемые коллеги! ..... 2

## ФОРУМ

**ВАК: защита высоких стандартов в науке. . . . . 6**

М. И. Гордеева

**Интеллектуальная собственность  
научных организаций и проблема  
ее принадлежности ..... 12**

В. В. Сычёв, А. В. Колесниченко

**Живые системы в России: взгляд сквозь  
призму научных публикаций ..... 19**

## ОБЗОРЫ

С. М. Деев, Е. Н. Лебедеенко

**Современные технологии  
создания непереносимых антител  
для клинического применения ..... 32**

Д. А. Скворцов, М. П. Рубцова, М. Э. Зверева,  
Ф. Л. Киселев, О. А. Донцова

**Регуляция теломеразы  
в онкогенезе ..... 51**

П. Массон, Д. Рошу

**Каталитические «биоловушки» против  
токсических эфиров, альтернативный  
подход для профилактики  
и лечения отравлений ..... 68**

И. Лаврик, П. Краммер

**Решение «жизнь-или-смерть»  
в системе CD95: основные  
про- и антиапоптозные модуляторы ..... 80**

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

А. В. Бачева, А. А. Белогуров, Н. А. Пономаренко,  
В. Д. Кнорре, В. М. Говорун, М. В. Серебрякова,  
А. Г. Габибов

**Анализ фрагментации основного  
белка миелина под действием  
протеасомы. . . . . 84**

К. А. Кондукторов, Г. С. Людва, А. В. Иванов,  
В. Л. Туницкая, С. Н. Кочетков

**Взаимодействие РНК-зависимой  
РНК-полимеразы вируса гепатита С с  
РНК-матрицами . . . . . 88**

О. В. Некрасова, А. И. Тагвей, А. А. Игнатова,  
А. В. Феофанов, М. П. Кирпичников

**Изучение мембранной локализации  
в *E. coli* рекомбинантных  
калиевых каналов. . . . . 91**

Е. Н. Люкманова, Г. С. Копейна, М. А. Шулепко,  
З. О. Шенкарев, А. С. Арсеньев, Д. А. Долгих,  
М. П. Кирпичников

**Бесклеточная продукция  
внеклеточного домена никотинового  
ацетилхолинового рецептора. . . . . 96**

В. А. Мордвинов, А. В. Марданов, Н. В. Равин,  
С. В. Шеховцов, С. А. Демаков, А. В. Катохин,  
Н. А. Колчанов, К. Г. Скрябин

**Определение полной нуклеотидной  
последовательности митохондриаль-  
ного генома возбудителя описторхоза,  
*Opisthorchis felinus*. . . . . 99**

Е. С. Филоненко, А. А. Гаврилов, С. В. Разин,  
О. В. Яровая

**В эритроидных клетках кур  
протяженный фрагмент  
хромосомы 14, включающий кластер  
альфа-глобиновых генов,  
организован в микропетли . . . . . 105**

Е. Л. Арсеньева, И. В. Кузьмин, Е. С. Мануилова,  
Е. В. Новосадова, Е. В. Муркин, Г. В. Павлова,  
В. З. Тарантул, И. А. Гривенников

**Получение и характеристика  
линии эмбриональных  
стволовых клеток мыши,  
трансфицированных геном  
нейротрофического фактора глии,  
слитым с геном зеленого  
флуоресцентного белка. . . . . 109**

Е. Н. Ильина

**Прямое МАЛДИ масс-спектрометрическое  
профилирование бактериальных  
белков для индикации  
и характеристики патогенов . . . . . 115**

В. Н. Лазарев

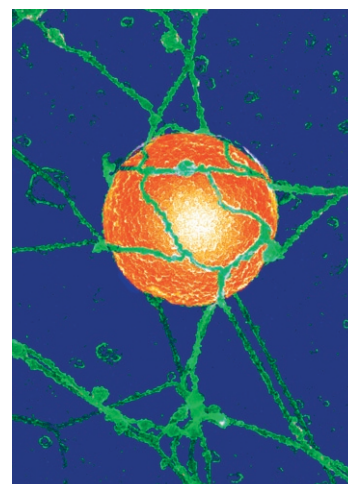
**Гены антимикробных пептидов  
для терапии внутриклеточных  
инфекций . . . . . 121**

Т. В. Пырков, Д. В. Пыркова, Е. Д. Балицкая,  
Р. Г. Ефремов

**Роль стэкинг-взаимодействий  
в комплексах белков с аденин-  
и гуанинсодержащими лигандами . . . . . 124**

**Правила для авторов . . . . . 128**

**ФОТО НА ОБЛОЖКЕ** Снимок тельца Кахала и контактирующих с ним актинсодержащих филаментов, изолированных из ядра ооцита лягушки. Фотография сделана Е. В. Киселевой в 2007 году с использованием высокоразрешающего низковольтного сканирующего микроскопа (Field Emission in Lenz scanning microscope ISI DS 130F, Torcon Corporation, Tokyo, Japan) в Институте Раковых исследований им. Паттерсона, г. Манчестер, Великобритания, в лаборатории проф. Т.Д. Аллена. Фотография победила в конкурсе «Наука – это красиво» в номинациях «Мир, скрытый от наших глаз» и «Приз зрительских симпатий». Конкурс проводился электронным изданием «Наука и технологии России – STRF.ru» при поддержке Министерства образования и науки и Федерального агентства по науке и инновациям.



# ВАК: защита высоких стандартов в науке

О роли, которую играет Высшая аттестационная комиссия России в управлении отечественной наукой, критериях профессионального отбора и месте, которое занимает научная периодика в этом процессе, в интервью журналу «Acta Naturae» рассказал председатель комиссии академик РАН Михаил Кирпичников

**Н**аука как система изучения природных объектов, социальных и гуманитарных явлений не имеет четко очерченных национальных рамок или границ, без международной составляющей наука «окукливается» и умирает. В связи с наднациональным характером науки все время идут дискуссии о роли научной периодики, особенно в нашей стране. В частности, речь идет о том, до какой степени при оценке состояния научных исследований в России следует доверяться формализованным публикационным критериям. И где грань между весом национальных журналов и международных?

Это очень непростой вопрос. Начну издаю: я считаю, что уровень формализации будет меняться всегда. Многие вещи в принципе не формализуемы. И не только в науке, а в творческой деятельности вообще. Во многом (но не только) по причине творческой составляющей. И поэтому такая дискуссия будет продолжаться. Да, гораздо проще все формали-

зовать, поставить «милиционеров», которые будут по существующим законам управлять «научным движением», чем создать нормальную экспертную систему. Оценивать уровень качества, особенно если речь идет о выдающемся специалисте, по его формальному цитированию, по импакт-фактору журналов, где он публикуется, – я считаю, что это правильно и это нужно делать. Но нужна еще и неформализуемая оценка. Поэтому я все-таки выступаю за равновесие между формальными критериями и нормальной экспертной системой. Подчеркну еще раз: уровень и вопросы экспертизы со временем будут меняться. Но всегда останется некое множество вопросов, которые не подвластны формализации. В этом и состоит главная проблема.

**Бытует мнение, что российских авторов дискредитируют в международной периодике. То есть на них меньше ссылаются просто по факту их российской аффилиации. Вы согласны с этим мнением?**



Михаил Кирпичников: «Мы не делим журналы на плохие и хорошие, мы делим журналы на те, которые используем для экспертизы, и те, которые не используем»

Я могу сказать, что придерживаюсь этой же точки зрения. Дискриминация есть. Я думаю, что свою отрицательную роль в этом сыграл фактор закрытого общества. Когда наше общество стало открытым (я специально говорю не «экономика», а шире – «общество»), началось выравнивание давления – как в сообщающихся сосудах. Но это не быстрый процесс – пройдут годы... Пока же фактор «закрытого общества» действует.



## РАЗБОР РОССИЙСКИХ НАУЧНЫХ ЖУРНАЛОВ

**Как Вы считаете, где проходит грань между качеством российской науки и качеством управления этой сферой, в т.ч. в области регулирования системы аттестации кадров высшей научной квалификации с помощью управления качеством научной периодики?**

Действительно, есть проблемы в российской науке и в системе аттестации кадров высшей научной квалификации. Я в данном случае говорю о Высшей Аттестационной Комиссии (ВАК). Что такое для системы аттестации – я подчеркиваю, не для меня как ученого, а именно для системы аттестации – научная периодика? Как мы ее пытаемся использовать? Прежде всего, как внешнего эксперта. Кроме того, мы априори достаточно вольны выбирать правила, по которым заказываем внешних экспертов, и попадание в эти внешние эксперты ВАК не является какой-то особой меткой (маркером) для журнала. Если результаты этой деятельности ВАК принесут некую пользу научной периодике – мы будем очень рады. В науке часто бывает так, что побочный результат приносит не меньшую пользу, чем достижение поставленной цели. Не надо далеко ходить за примерами: создание коллайдера привело к созданию интернета. И что из них важнее теперь? По крайней мере, это сравнимые вещи. Однако когда начинали строительство в ЦЕРНе, никто не ставил задачу создать Всемирную паутину, это точно.

Моя позиция такая: я не хотел бы, чтобы отождествляли проблемы проведения аттестации и проблемы российской научной периодики.

**Недавно Вы приняли участие в конференции «Научный журнал в России: актуальные проблемы и перспективы развития в современных условиях», которая прошла в Москве в Политехническом музее. Как Вы оцениваете ее итоги?**

Во-первых, замечу, что мы изначально не являлись организаторами этого мероприятия, но когда узнали о конференции, с удовольствием присоединились. Мы все равно планировали собрать редакторов, издателей и обсудить перспективы. В этом

плане я абсолютно удовлетворен результатами конференции. На самом деле, задача у организаторов была гораздо более широкая, более важная для научного сообщества – вообще разобраться с российской научной периодикой. Это я говорю уже не как председатель ВАК, а как представитель ученой братии. Я именно такое выступление и сделал на конференции, чтобы развести собственно проблемы научной периодики и проблемы внешней экспертизы, связанные с Перечнем ВАК.

## ПЕРЕЧЕНЬ ЖУРНАЛОВ ВАК – МЕРА ВРЕМЕННАЯ

**Какое место в этом управлении научной занимает т.н. «список ВАК» – перечень отечественных и иностранных журналов, публикации в которых необходимы для защиты диссертаций?**

Мы рассматриваем «список ВАК» как элемент существующей системы научной аттестации. Она начинается с соискателя; продолжается тем, что вокруг соискателя – это рецензент, ведущая организация, диссертационный совет; потом – экспертный совет ВАК, и уже потом – собственно ВАК. Это все система аттестации, которую надо представлять себе, когда произносишь слово «ВАК». Я глубоко убежден, что главная проблема, которая есть и остается в системе аттестации, – это катастрофическое падение уровня диссертаций в 90-х-начале 2000-х. И не только падение уровня, но и «потеря жанра», как я обычно говорю. Под этим понимаю вот что: изначально, да и по сегодняшним правилам, диссертационные работы предназначены для научно-педагогической аттестации, это научно-квалификационные работы, а отнюдь не проекты законов, которые стали часто предлагать, либо проекты каких-то инструкций. Причем, опять же, я ничуть не преуменьшаю значение такой деятельности. Проект закона может оказаться важнее тысячи диссертаций, когда он выйдет, но это другой жанр. Так вот, существуют самые разные способы повышения планки диссертаций. Часть способов лежит внутри той самой системы аттестации, о которой я сказал. С моей точки зрения, самое болезненное и при этом самое действенное в данной системе – диссертационные советы. Изменения

на этом уровне могут привести к наибольшим изменениям в самой системе. Из других способов воздействия на повышение уровня диссертаций выделяю внешнюю экспертизу. И уже внутри внешней экспертизы один из вопросов – это научная периодика. Только один из важных вопросов.

В последнее время мы узаконили – и это, я считаю, наше достижение – в качестве элемента внешней экспертизы патенты. При защите в области технических наук они ничуть не менее важны, чем публикации. В свою очередь, монографии особенно важны для гуманитарных и общественных наук. Конечно, имеются в виду монографии серьезные, отрецензированные.

Итак, у ВАК на сегодняшний день есть потребность в такой внешней, коллективной экспертизе, как научная периодика. Эта проблема возникла не сегодня и была поднята отнюдь не нами, а нашими предшественниками, когда еще в 2001-2002 гг. возник первый вариант «списка ВАК». Но, как часто бывает в России, документы могут существовать в виде нормативной базы, но даже те, кто их создал, сами мало на них обращали внимание. Таким образом, до 2005 г. о Списке ВАК мало говорили, и заговорили лишь потом, когда им стали пользоваться. В результате люди почувствовали, что это не пустое.

Я с самого начала понимал, что надо уйти от «списка ВАК» как такового, а уже с конца 2006 г. публично стал высказываться на эту тему. Подчеркну еще раз: данная мера абсолютно вынужденная и временная. Возникновение этой проблемы связано, как я уже отмечал выше, с уровнем диссертаций, «чистотой» этого жанра и т.д. И, как следствие, мы только в конце 2007 г. разобрались с «проклятым наследием» прошлого – с апелляциями на докторские диссертации 1999-2000 гг., которые были защищены без единой публикации. В качестве публикаций предлагались какие-то отчеты, тезисы к конференциям. Так и родилась вполне здоровая идея привлечь внешнюю экспертизу. То, что ею практически не пользовались, это второй вопрос. С середины 90-х до 2006 г. рост защит шел экспоненциальными темпами, почти по 15% ежегодно, и только в 2006 г. это было остановлено.



Вернемся к Перечню. Правила попадания в Перечень ВАК предполагалось сделать достаточно прозрачными, чтобы сам процесс выбора этих журналов не зависел ни от председателя ВАК, ни от ВАК (минимально, по крайней мере), ни от экспертных советов. Задача и ВАК, и председателя ВАК, и экспертов – составить критерии. Как только критерии написаны, необходимым и достаточным условием попадания в перечень ВАК становится соответствие этим критериям. Удавалось ли это сделать? Наверное, плохо удавалось. Но изначально существовало понимание, что это временная мера, и предполагалось впоследствии уйти от специального перечня ВАК и перейти к публичным базам данных. Такая цель объявлена, задекларирована, висит на сайте ВАК с 2008 г.

**СПИСОК ВАК ЗАМЕНИТ ПУБЛИЧНАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ БАЗА ДАННЫХ!**

**Какой Вы видите политику ВАК в этом вопросе в перспективе?**

Важно то, что мы впервые, в отличие от нашей предыдущей деятельности, вообще объявляем политику ВАК в отношении Перечня на пять лет. Сегодня мы формулируем в качестве достаточных условий попадания в Перечень ВАК наличие журналов

в публичных международных базах научной периодики – Web of Science, Scopus (со временем этот список может быть продолжен). Попадание туда автоматом засчитывается как обязательная публикация в Перечне ВАК. То же самое ждет и российские журналы. Сегодня это требование чересчур жесткое для них (ему удовлетворяет всего 2-3 сотни журналов). А мы все-таки занимаемся аттестацией в России. Поэтому и предлагається переходный период – пять лет.

**Жесткое – в каком смысле? С точки зрения качества статей? Или журнального бизнеса?**

Я не хотел бы уходить в область журнального бизнеса, потому что это уведет нас в сторону. Пусть этим занимаются профильные органы. Что же касается нас, то на недавно состоявшемся президиуме ВАК мы приняли некоторые поправки к нашим критериям и их опубликуем. Более того, требования, которые мы сейчас публикуем, будут действовать в течение пяти лет. Скажу сразу, они учитывают многие предложения, высказанные на конференции в Политехническом. Но если мы увидим какие-то перемены на российском поле журналов, требования будут меняться.

Что касается журналов, то основные их претензии поначалу были связаны именно с тем, что им не хотелось ничего менять. Когда же мы серьезно поговорили, выяснилось, что они не готовы. К примеру, в коммерческом плане не готовы иметь в электронном виде полнотекстовые версии. Мы сняли это требование. Если прежде как только выходил номер журнала, нужно было сразу выпускать и его онлайн-версию, то сейчас это требование заменено выпуском электронной версии по подписке или в свободном доступе с лагом в год. Таким образом, снимаются все претензии по коммерческим вопросам издателей, все вопросы, связанные с реальной неготовностью к этому делу. Мы – ВАК и вольны сами выбирать экспертов. Мы хотим иметь именно таких экспертов. Я уже сказал на конференции и сейчас готов повторить: мы не делим журналы на плохие и хорошие, мы делим журналы на те, которые используем для экспертизы, и те, которые не используем. Согласитесь, смешно обсуждать, что лучше – Playboy или Nature.

**Инструмент, которым вы управляете, по сути один – список? Вы же не можете его закрыть.**

Не могу. Я понимаю, чем вызван такой интерес к проблеме журналов, но это песчинка в море аттестации. Для нас эта песчинка – один из очень многих инструментов экспертизы, но попутно она поможет избавить научную периодику от журналов, которые не рецензируются или плохо рецензируются.

Когда весной 2006 г. распоряжением правительства появилось требование иметь для защиты диссертации хотя бы одну обязательную публикацию в журнале из перечня ВАК, было предъявлено и требование обязательного опубликования в интернете авторефератов докторских и кандидатских диссертаций. Сегодня оно выполнено, и я считаю его значение бесспорно положительным. Бури возмущений эта мера не вызвала: буквально с самого начала все пошло хорошо – именно потому, что она бесспорна. В этом направлении мы и дальше двигаемся, хоть это и очень трудно с нашими материально-техническими возможностями. Я думаю, со временем, по мере готовности, появятся и защи-

ты с электронным доступом, т.е. можно будет при желании «зайти» на защиту онлайн и задать соискателю вопрос.

В принципе, перечень – вещь и спорная, и временная, это действительно административная мера. Но сегодня это все-таки реальный способ воздействовать на ситуацию.

**Чтобы напечатать статью в некоторых журналах, в том числе хороших, требуется заплатить деньги...**

Это нормально, с моей точки зрения.

Но важно заранее знать правила публикаций в том или ином журнале. Журнал должен публиковать правила для авторов. Это отражено в новых критериях. Если в журнале опубликовано, что страница в нем стоит рубль, то она не может стоить тысячу рублей. А разница – это расчеты под столом, черный бизнес и т.д. Вот против чего я возражаю. Есть ряд очень серьезных международных платных журналов, и это нормальная ситуация. Другой вопрос, связанный, может быть, с реалиями нашей страны, состоит в том, что мы требуем от всех журналов, которые хотят быть в перечне ВАК, ввести бесплатные публикации для аспирантов. Это требование есть и в новых критериях и, опять же, вызывает много нареканий. Требование не безупречно, это понятно, но безупречных решений не бывает. Как быть со статьёй, у которой аспирант в качестве «паровозика» и шесть докторов наук в соавторстве?!

В 2006-2007 гг. просто шум в ушах стоял: «Берут деньги». ВАК может только принять решение по выведению данного журнала из списка ВАК. Но ни одного заявления подобного рода не было. Понимаете, без бумаги работать над решением этой проблемы трудно. С другой стороны, понятно, что автор боится за свою судьбу и т.д.

**У вас есть база данных по всем, кто получил научную квалификацию, – кандидатам, докторам. Какой глубины эта база?**

Я бы сказал, что сегодня она приводится в порядок. Вообще, широкое использование ИТ-технологий – одно из магистральных направлений в нашей работе. Мы готовы к буре, которая может подняться, если мы предложим публиковать в электронном виде полнотекстовые версии диссертаций.

Другая ситуация: если мы хотим быть вместе с цивилизованным миром, то нам просто необходимо переходить на электронные публикации. Но, учитывая, что сейчас вся система паролей и т.п. в России может не работать (технически это возможно, а ментально – нет), я с легким сердцем принимаю позицию издателей, которая прозвучала в Политехническом. А вот со временем, думаю, нам удастся провести и эту меру.

Еще одна важная вещь: мы будем бороться за равноправие электронных изданий, включенных в наш перечень. Это дается очень тяжело. Порой трудно объяснить, что электронный журнал ничем не лучше, но и не хуже, чем печатный. Так же в свое время было трудно объяснить необходимость публикации авторефератов в электронном виде, довести до сознания мысль, что воровать больше не будут.

**ПРО КУПЛЮ, ПРОДАЖУ И ВОРОВСТВО ДИССЕРТАЦИЙ**

**Существует ли в ВАК какая-то автоматизированная система по борьбе с плагиатом?**

Есть система «Антиплагиат», которую мы запускали с большим пиаром. Сейчас она существует, но из-за материально-технических проблем работает в пилотном режиме. Мало терминалов с доступом к этой программе. Но я думаю, что в условиях такой огромной страны, как Россия, она обречена работать в пилотном режиме, поскольку порядка 30 000 диссертаций никто пропускать на антиплагиат не будет. Есть примеры, когда система срабатывала.

Само по себе принятие такого политического решения, которое можно сравнить с красным сигналом светофора, я считаю крайне важным. Понятно, правила дорожного движения далеко не все соблюдают, некоторые ездят на красный свет, но гораздо больше людей все же останавливаются, именно потому что знают, что их могут поймать, выписать штраф и т.д. Так что сам факт и объявление того, что мы используем программу «Антиплагиат», я считаю гораздо более важным, чем поймать за руку одного-двух недобросовестных авторов и прилюдно их высечь.

Хотя публичная ответственность – мера тоже очень полезная. Мы ее

ввели по всей цепочке аттестации (от соискателя – через оппонентов и публичные советы), т.е. все должны отвечать за свои дела, и если кто-то где-то проштрафился, это чревато оглаской. Но у публичной ответственности есть свои сложности. Вообще, выступления в прессе обычно заканчиваются судами, потому что люди, которых ловят за руку, как правило, не робкого десятка, они воспитаны в условиях, когда кто громче заорал, тот и прав, поэтому есть проблемы. А в аппарате, на который ложится вся эта нагрузка, всего 45 человек.

**Но проблема выглядит политической: существующая тяга к защите диссертаций в области экономики, социологии и управления у чиновников, депутатов и бизнесменов дискредитирует систему научной аттестации. Есть Вы, академик, настоящий доктор наук, и доктор, который написал диссертацию «Еще к вопросу об управлении на примере тьмутарканского аула».**

Если мы имеем в виду проблему купленных диссертаций, то тут очень трудно говорить об их проценте от общего числа защищаемых работ, на самом деле он невелик. Но вот что важно. Я не очень часто езжу в метро, а тут однажды поехал и услышал, как люди делились сведениями о том, где дешевле защититься. Неприятно. Моральные последствия этого действительно страшные. Я представляю, какой урон престижу науки наносит каждый такой факт. Но, знаете, в подобных случаях я всегда ссылаюсь на закон возрастания энтропии, который действует и в естественной природе, и в социальной сфере. Первое следствие этого закона таково: если не делать ничего, то беспорядок будет нарастать, а если надо что-то ввести в русло, то требуется приложить огромные усилия.

**ПЛОХИЕ АСПИРАНТЫ – ПЛОХИЕ ДИССЕРТАЦИИ**

**Если мы говорим о низком качестве подготовки диссертаций к защите, то, наверное, это повод задуматься о качестве аспирантуры?**

К сожалению, сегодня нормативная база такая, что ВАК отвечает только за аттестацию кадров высшей квалификации. За подготовку кадров

высшей квалификации ВАК не только не отвечает, он не имеет ни одной самой тоненькой ниточки, за которую можно было бы тянуть, чтобы влиять на ситуацию в этой области. Я все время про это говорю. Это огромный пробел в нормативной базе, с которым надо что-то делать. Что получается? Открывают аспирантуры в организациях, где кандидатов-то единицы, и тут же гонцы бегут в ВАК просить, чтобы дали положительный отзыв для открытия диссертационного совета. Аспирантуры создаются без ВАК, запрашивают экспертизу ВАК лишь для того, чтобы открыть диссертационный совет.

Если сравнивать аспирантуру 1996 г. с аспирантурой 2006-2007 гг. по количеству учащихся – 60 тыс. и 150 тыс. человек по стране соответственно – то видно, что аспирантура выросла в три раза. Ясно, что при таком подходе какой бы строгой ни была система аттестации, нормально работать она не может. По-прежнему существует колоссальное внешнее давление, с которым мы стараемся бороться. У нас приблизительно половина аспирантских мест отдана общественным и гуманитарным наукам, а исследованиями в этой области занимаются лишь 5 % от общего количества научных работников. Ситуация проецируется на систему аттестации. Защищают у нас в этих сферах тоже порядка 50 %. Вот и получается такой театр абсурда. Эта картина не отражает интересы общества и государства.

**То есть ВАК обладает в этой истории минимальными полномочиями?**

В плане подготовки аспирантов – никакими. Но с точки зрения сроков я полностью солидарен с ректором Баманского университета Игорем Борисовичем Федоровым: в области технических и естественных наук обучение в аспирантуре должно быть не меньше четырех лет, иначе получается профанация. Я думаю, что и в Министерстве образования и науки разделяют это понимание проблемы, но уж очень велика сила инерции.

**СИСТЕМА АТТЕСТАЦИИ В ПЕРСПЕКТИВЕ**

**Каков порядок защиты кандидатских диссертаций, в отличие от докторских?**

Если защищается докторская диссертация, она в обязательном порядке проходит через экспертный совет ВАК. Кандидатская диссертация считается защищенной решением только диссертационного совета, именно поэтому с ними больше проблем. Когда для утверждения этого решения кандидатская поступает в ВАК, экспертный совет смотрит ее только в выборочном порядке. Исключение составляют случаи, когда защищается человек, не работающий ни в науке, ни в образовании, таких авторов мы, по решению президиума, требуем обязательно вызывать на экспертный совет – просто чтобы проверить их квалификацию. Таким образом, кандидатская диссертация становится объектом внимания экспертных советов ВАК скорее в порядке исключения. Это к вопросу, нужен или не нужен ВАК.

В перспективе, возможно, персональная аттестация (и кандидатов и докторов) если не полностью, то во многом отойдет на уровень университетов и сильных научных организаций. Но сегодня для этого нет никаких условий.

Для начала нужно создать систему собственных Кембриджей, Оксфордов, МИТ с их авторитетом и заботой о своем имидже, а затем подумать о новой нормативной базе. А на это потребуются многие годы. Если же мы сегодня снимем этот барьер, то будем иметь не 30 тыс., а 300 тыс. диссертаций в год. Я гарантирую, что это будет сразу же. Такова наша психология.

Кроме того, надо помнить, что система социального поощрения в науке у нас привязана напрямую к научным степеням.

Наконец, еще одно соображение, связанное с системой аттестации, ее развитием в будущем. Я не знаю, когда мы будем готовы передать аттестацию конкретному ВУЗу в таких сферах, где, как мне кажется, государство должно оставаться дольше: медицина, наука, образование, вопросы безопасности страны.

Означает ли это, что государство не должно вообще заниматься сферой аттестации, как многие поверхностно понимают? Нет, я думаю, что из функций государства должна уйти персональная аттестация. Но сама атте-

стация диссертационных советов, отслеживание их уровня – это функция государства во всех цивилизованных странах. Такие органы есть везде.

**Будет ли проведена переаттестация тех, кто защитился в других, более мягких условиях?**

Нет, я считаю, что закон не может иметь обратной силы. Если я правильно вас понял, вы спрашиваете, не пострадают ли от неравных условий те, кто будет защищаться в более жестких условиях? Если мы признали ошибку снижения планки (думаю, сегодня ее все признали), то надо ошибку исправлять.

Самое страшное будет заключаться в другом. Серость творит серость. А это вопрос престижа науки!

Вообще по поводу системы аттестации научно-педагогических кадров выскажусь так: при всех недостатках ВАК, я думаю, это лучшая экспертная система в России, наиболее отработанная, продвинутая, и она могла бы быть моделью создания общественно-государственной экспертизы по всем важнейшим вопросам. У нас, пожалуй, единственный такой пример. ВАК – это двуединство институтов гражданского общества в лице научной, преподавательской корпорации, объединенной в академии, в общества, союзы ректоров и т.д., и государства. Это понятно.

Сложности начинаются при взаимодействии, мы очень их ощущаем. Почему, к примеру, на Западе экспертная система работает, а в России не очень? Тому есть две главные причины. Во-первых, бесплатные экспертизы хорошими не бывают, а ВАК лет десять вообще не получал никаких денег, сейчас мы их добились, но пока не можем добиться утверждения способа их траты.

Второй краеугольный камень, на котором стоит экспертиза, это публичная ответственность. Эксперт должен знать, что если он уличен в нечестности, то будет изгоем в своем сообществе. От этого на самом деле многое зависит, и дело вовсе не в коррупции, о которой говорят больше, чем следовало бы, а просто в том, что в России называется «кумовство» в широком смысле этого слова. Способ бороться с этим один. И когда я пришел в ВАК,

первое, что сделал – предложил поменять состав экспертных советов где-то на 40 %, не потому, что там воровали, а потому, что нельзя по 30 лет сидеть в экспертном совете: ты становишься звеном цепочки, даже помимо своего желания. Экспертная система должна подвергаться ротации.

Следующий шаг – диссертационные советы. Уверен, это главное звено системы аттестации. В 2006 г. мы отказались от разовых советов. Что это такое? Это когда к нам приезжал на большой машине важный человек и, используя административный, а иногда денежный ресурс, под свою защиту продавливал создание совета. За все эти годы не было создано ни одного такого совета. Была ликвидирована сеть резервных советов (порядка тысячи). Все хорошие советы резервной сети были переведены в основную сеть. Это был первый этап работы по оптимизации диссертационных советов. В 2007-2008 гг. мы провели полную переаттестацию советов. Сегодня уже вал закончился. Я думаю, что все пришло в состояние динамического равновесия. Мы закрываем за различные нарушения столько же советов, сколько и создаем. На начало 2006 г. было четыре с небольшим тысячи диссертационных советов. Сегодня работают три тысячи.

**Нужно ли вводить особые уровни научной квалификации для управленцев (экономистов)?**

Я считаю, что нужно, только не научной. Давайте оставим на минуту за скобками разного рода проходимцев. Мы говорим о честных (первое), честолюбивых (второе) и блестящих (третье) специалистах в своей области. У них есть потребность быть аттестованными общественностью и государством. Так же, как это имеет место в случае научно-педагогической аттестации. Здесь можно двояко подходить – либо искусственно пытаться бороться с этим делом, неизбежно создавая ниши для коррупции, либо пойти по пути горизонтального соответствия. Надо будет сказать: сегодня есть система научно-педагогической аттестации, олицетворяемая существующей ВАК. Необходимо дать возможность получения соответствующего статуса администраторам,

практическим юристам, бизнесменам и т.д. Можно сделать это и в рамках существующей системы аттестации. Но правила игры будут совсем другие. И тогда надо добавлять совсем других экспертов. В рамках этой государственно-общественной аттестации можно будет давать людям возможность защищаться. Скажем так, предполагаемая система не совсем аналогична системе «магистр/доктор бизнес-администрирования», но в чем-то похожа на нее. Этим честным, честолюбивым людям можно будет сказать: доктор экономических наук ничем не лучше, но и не хуже, чем доктор делового администрирования. То же правило работает для доктора делового администрирования: он ничем не лучше (но и не хуже!), чем доктор физ.-мат. наук. Значит, надо принять какое-то решение двигаться в части горизонтального соответствия. К чему это приведет? Во-первых, еще раз повторю: если есть социальный заказ, его потребности надо удовлетворять. Бессмысленно с ним бороться, как мне кажется. Это одна из идей. О ней я и хотел рассказать. Конечно, это снизит давление в котле научно-педагогической аттестации. Другой вопрос (есть возражения такого сорта), что наши губернаторы, политики, бизнесмены все-таки хотят быть «великими» учеными, а не «великими» администраторами.

На самом деле, государство может задать стандарт, что оно принимает на работу в органы государственного управления людей, обладающих MBA (условно говоря).

**О «СТАРЫХ» И «НОВЫХ» НАУКАХ**

**Есть ли необходимость менять классификацию научных специальностей в связи с появлением «новых» наук, изучающих явления на стыке «старых»? Как к этому относится ВАК? И что делать людям, которые работают на междисциплинарном уровне?**

Понимаете, в предыдущий раз научные специальности пересматривали, когда я был министром. В 2006 г. я, уже будучи председателем ВАК, написал письмо Андрею Александровичу Фурсенко, где говорил: пора бы уже пересмотреть их. Наука не стоит на месте. В нормативных документах значит, что такая процедура

должна проводиться раз в пять лет. Я сознательно это сделал, чтобы прояснить – это забота не ВАК, а Министерства науки и образования. Это вопрос научно-технической политики. На основании научных специальностей должны формироваться не только специальности для защиты (и, соответственно, диссертационные советы), но и научно-технические программы и многое другое. Нужно поднять вопрос соответствия научных специальностей и специальностей высшей школы, чего у нас вообще никогда не делалось. Это гораздо интереснее, чем сравнивать несоответствие наших и западных специальностей. Сейчас, когда все сосредоточено в руках одного министерства, у него есть уникальная возможность сделать это. Таким образом, научные специальности – вопрос не ВАК, а научно-технической политики государства. И ВАК – такой же потребитель этой системы, как, например, высшая школа.

Теперь мое личное отношение ко всему упомянутому. Если говорить вульгарно, природа не знает, что такое физика, химия и биология. Просто есть единая природа. Потом человек в силу того, что у него так устроен менталитет, начал составлять модели. И вот возникли биология, химия и т.п. Появились абсолютно объективные физические, химические, биологические методы. Но природа-то об этом не знает! Именно поэтому наиболее интересная вещь, с моей точки зрения, возникает на границах. Даже если мы введем более тонкое деление на биофизику, биохимию, биоорганику, молекулярную биологию, наиболее интересные вещи будут происходить не под фонарем, а на стыках. Я тут не вижу особого противоречия. Здесь нельзя построить модель «на все времена». Модели должны меняться. Наше представление о науках должно меняться в соответствии с развитием уровня естествознания. Я думаю, что то же самое относится и к обществу. Хотя, конечно, это предмет особого разговора. ●

*Беседовал Константин Киселёв, главный редактор электронного издания «Наука и технологии России» STRF.ru*

# Интеллектуальная собственность научных организаций и проблема ее принадлежности

М. И. Гордеева  
ООО «Парк-медиа», Москва

Одной из наиболее острых проблем, возникающих на пути построения инновационной экономики нашей страны, является несовершенство правовой базы, регламентирующей процессы создания коммерчески привлекательной продукции на базе новых технологий. Очень многие специалисты – как непосредственно ученые, так и представители бизнес-структур – единодушно сходятся во мнении, что ныне существующие законы не могут эффективно определять процесс построения инновационных цепочек. Не будет преувеличением сказать, что ныне существующие законы не ориентированы на построение экономики, основанной на знаниях. Пожалуй, самый важный вопрос из числа существующих – вопрос о правах на вновь создаваемую интеллектуальную собственность. Кому она должна принадлежать – самим ученым, бизнесу, государству – и в какой мере? Попробуем разобраться в сущности проблемы, рассмотрев в настоящей статье вопрос, какими правами обладает научная организация на создаваемые в ее рамках продукты интеллектуальной деятельности.

## **ПРАВА НА ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНУЮ СОБСТВЕННОСТЬ С ТОЧКИ ЗРЕНИЯ СУЩЕСТВУЮЩЕЙ ЗАКОНОДАТЕЛЬНОЙ БАЗЫ**

Вплоть до конца прошлого века большое внимание в правовой базе уделялось вопросу защиты интересов государства в отношении использования результатов научно-исследовательских, опытно-конструкторских и технологических работ военного, специального и двойного назначения. В частности,

Указ Президента РФ от 14 мая 1998 г. № 556 и принятые в рамках исполнения этого Указа Постановления Правительства, а именно, Постановление Правительства от 29 сентября 1998 г. № 1132 «О первоочередных мерах по правовой защите интересов государства в процессе экономического и гражданско-правового оборота результатов научно-исследовательских, опытно-конструкторских и технологических работ военного, специального и двой-

ного назначения», Постановление Правительства РФ от 2 сентября 1999 г. № 982 «Об использовании результатов научно-технической деятельности», Положение о государственном учете результатов научно-исследовательских, опытно-конструкторских и технологических работ военного, специального и двойного назначения, права на которые принадлежат РФ, утвержденное Постановлением Правительства РФ от 26 февраля 2002 г. № 131 и др.

Все эти документы априори закрепляли за государством права на результаты проведенных работ военного, специального и двойного назначения, а также устанавливали требование о ведении обязательного учета всех разработок указанного типа.

Постановление Правительства РФ от 2 сентября 1999 г. № 982 «Об использовании результатов научно-технической деятельности» (с изменениями от 17 ноября 2005 г.) установило, что права на результаты научно-технической деятельности, полученные за счет средств федерального бюджета, подлежат закреплению за Российской Федерацией, если:

- права на такие результаты не включены в установленном порядке в состав приватизированного имущества;
- эти результаты не являются объектами исключительных прав физических или юридических лиц;
- на эти результаты не поданы в установленном порядке заявки на получение исключительных прав.

Большинство результатов научно-технической деятельности гражданского назначения, созданных в советский период, или также закреплены за государством, или вообще не идентифицированы и не учтены, поскольку научные организации в то время не уделяли должного внимания вопросу закрепления за собой прав на создаваемые охраноспособные объекты – в силу отсутствия как финансов, так и коммерческого интереса.

Все это привело к ситуации, при которой большая часть созданных нематериальных активов не отражена (или отражена не полностью) на балансе научных организаций, не имеет правоустанавливающих документов, хотя и является предметом хозяйственного оборота, правда, не всегда легитимного.

Первым шагом на пути смещения государственной политики в сторону рассмотрения и защиты интересов непосредственных исполнителей и коммерческого сектора в вопросах распределения прав на результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере можно назвать принятие Постановления Правительства РФ

№ 685 от 17 ноября 2005 г. «О порядке распоряжения правами на результаты научно-технической деятельности», которое утвердило Положение о закреплении и передаче хозяйствующим субъектам прав на результаты научно-технической деятельности, полученные за счет средств федерального бюджета (следует отметить, что в настоящее время готовятся поправки к данному постановлению в связи с принятием Федерального закона о технологиях, о котором будет сказано ниже). В дальнейшем начатые изменения были закреплены на уровне федеральных законов.

Так, с 1 января 2008 г. вступила в силу четвертая часть Гражданского кодекса (ГК РФ), регулирующая правоотношения, возникающие в связи с созданием и оборотом результатов интеллектуальной деятельности. А в конце 2008 г. был принят Федеральный закон «О передаче прав на единые технологии» (ФЗ № 284-ФЗ от 25.12.2008 г.), необходимость принятия которого была заложена в ГК РФ.

Как же выглядят процессы закрепления прав на результаты интеллектуальной деятельности, в т.ч. созданные за счет бюджетных средств, в контексте нового законодательства?

Основой взаимодействия научной организации с заказчиками своей продукции является договор (на создание, передачу и использование научной и (или) научно-технической продукции, оказание научных, научно-технических, инженерно-консультационных и иных услуг, а также составление других договоров, в т.ч. договоров о совместной научной и (или) научно-технической деятельности и распределении прибыли и пр.). Существенную часть таких договоров составляют государственные контракты.

Гражданский кодекс (ГК) РФ отдает приоритет в распределении прав на результаты научно-исследовательских, опытно-конструкторских и технологических работ (далее – НИОКР), в т.ч. способных к правовой охране, договору. Вместе с тем, согласно статье 1298 ГК РФ, исключительные права на произведение науки, созданные по государственно-

му контракту, принадлежат РФ либо совместно исполнителю и РФ.

Если в соответствии с государственным контрактом **исключительное право закрепляется за РФ**, то исполнитель обязан путем заключения соответствующих договоров со своими работниками и третьими лицами приобрести все права для их последующей передачи РФ.

Если **исключительное право принадлежит исполнителю**, то он обязан по требованию государственного заказчика предоставить указанному лицу безвозмездную простую (неисключительную) лицензию на использование соответствующего произведения науки для государственных нужд.

В случае же **закрепления исключительных прав совместно за исполнителем и РФ** государственный заказчик вправе предоставить третьему лицу безвозмездную простую (неисключительную) лицензию на использование такого произведения науки для государственных или нужд, уведомив об этом исполнителя.

Порядок распределения прав на изобретение, полезную модель, промышленный образец, созданные в рамках исполнения государственного контракта, фактически повторил существовавший ранее и закрепленный в Патентном законе (в редакции Федерального закона № 22-ФЗ от 7 февраля 2003 г.).

В частности, право на получение патента на изобретение, полезную модель или промышленный образец в случае выполнения государственного контракта принадлежит исполнителю (подрядчику), если государственным контрактом не предусмотрено иное.

Подрядчик (исполнитель) должен уведомить в письменной форме государственного заказчика о получении результата, способного к правовой охране в качестве изобретения, полезной модели или промышленного образца. Начиная с момента уведомления и в течение последующих шести месяцев, государственный заказчик имеет право подать заявку на выдачу патента на свое имя. Указанный срок является пресекательным, и если государственный заказчик этого не сде-

лает в течение указанного срока, право на получение патента имеет исполнитель (подрядчик).

В случае, если, в соответствии с государственным контрактом, права принадлежат РФ или совместно РФ и исполнителю, то применяется порядок, аналогичный описанному выше в части создания произведений науки.

Важным моментом государственного контракта является закрепление в нем условий распределения прав на использование результатов научной деятельности.

Федеральный закон от 21 июля 2005 г. № 94-ФЗ «О размещении заказов на поставки товаров, выполнение работ, оказание услуг для государственных и муниципальных нужд» предусматривает следующую процедуру составления итогового текста контракта с победителем конкурса: включение условий исполнения контракта, предложенных победителем конкурса в заявке на участие в кон-

Результатом научно-технической деятельности достаточно часто является комплексный объект, включающий в себя в том или ином сочетании изобретения, полезные модели, промышленные образцы, программное обеспечение, технические данные, информацию и прочее. Такой комплексный объект в рамках гражданского законодательства получил название «единая технология» и был введен четвертой частью ГК РФ. Заметим, что единая технология сама по себе не является объектом интеллектуальных прав. Однако, в силу того, что в составе единой технологии могут быть как охраноспособные элементы, так и не подлежащие правовой охране, данный объект все же попадает под регулирование четвертой части ГК.

Научные разработки бюджетных госучреждений и иные результаты научной деятельности, финансируемые за счет бюджета, как раз и со-

ной является конкурсная процедура. По общему правилу конкурсы и аукционы являются открытыми. Проведение закрытых конкурсных процедур допускается в тех случаях, когда сведения о технологии составляют государственную тайну.

В соответствии с п. 3. ст. 1547 ГК РФ ФЗ о технологиях закрепляет за исполнителем, которым было организовано создание технологии, преимущественное право на заключение с РФ или ее субъектом договора о приобретении права на технологию. Исполнитель должен быть приглашен для участия в конкурсе или аукционе вне зависимости от того, открытым или закрытым является конкурс или аукцион.

Победителем конкурса на право заключения договора об отчуждении права на единую технологию или лицензионного договора признается лицо, предложившее лучшие условия практического применения (использования, внедрения) технологии в РФ, включая планируемые экономические показатели.

Победителем аукциона признается лицо, предложившее наиболее высокое вознаграждение по договору об отчуждении права на технологию. При прочих равных условиях победителем признается исполнитель.

В такой формулировке настораживает фраза «при прочих равных условиях». Существующая на текущий момент практика проведения конкурсов и выбора победителя не последнее место отводит именно предлагаемой цене контракта (это относится и к обеспечению условий внедрения).

Следовательно, исполнитель, понесший из собственных средств определенные затраты на получение конкретного результата научно-технической деятельности (включая использование уже имеющихся у него разработок, приобретение прав на результаты интеллектуальной деятельности у иных правообладателей), вынужден – и не всегда успешно – конкурировать с третьими лицами по ценовому критерию.

Одним из существенных условий договоров о передаче технологий является обязанность внедрения технологий в практическую деятельность. ФЗ о технологиях в целях поддержки и стимулирования доведения по-

## Правильная идентификация результатов деятельности как единой технологии требует четкой правовой регламентации на федеральном уровне

курсе, в проект контракта, прилагаемый к конкурсной документации.

Исходя из изложенного, представляется целесообразным прописать в договоре порядок распределения прав на результаты работ, особенно если права закрепляются совместно за РФ и исполнителем. К сожалению, на практике этого не делается. Раздел государственного контракта, посвященный вопросам распределения прав на создаваемые объекты, просто копирует нормы закона и не закрепляет четкий механизм взаимодействия сторон, как на этапе создания охраноспособного объекта, так и в части его последующего использования. А это, в свою очередь, приводит к несоответствию того, что реально было создано в рамках государственного заказа, и того, что представлено в отчетных документах и отражено в бухгалтерской базе, – и, следовательно, является поводом для споров.

ставляют основную часть единых технологий на сегодняшний момент. К сожалению, правоприменительной практики, относящейся к передаче технологий, созданных за счет или с привлечением бюджетных средств, на сегодняшний день фактически не существует. Поэтому правильная идентификация результатов деятельности как единой технологии, установление единых правил распределения правами на технологии, обязательства государства и частного сектора по последующему внедрению технологий требуют четкой правовой регламентации на федеральном уровне.

Федеральный закон о технологиях устанавливает порядок отчуждения РФ и/или ее субъектом принадлежащих им прав на технологии. Отчуждение может осуществляться на конкурсной основе или в результате проведения аукциона. Приоритет-



лученных решений до практической реализации вводит практику заключения на конкурсной основе договоров о выполнении дополнительных работ по доведению единых технологий до стадии практического применения. Данные работы выполняются с привлечением внебюджетного финансирования и с учетом интересов лица, финансирующего эти работы в целях последующего приобретения прав на технологии. Выполнение такого комплекса работ актуально в случае, если права на технологию изначально были закреплены за РФ или если первоначальный исполнитель государственного контракта не обеспечил всех действий, необходимых для закрепления за ним прав на полученный результат.

В соответствии с договором о выполнении дополнительных работ по доведению единой технологии до стадии практического применения с учетом потребностей заинтересованного лица (инвестора проекта) исполнитель обязуется проводить дополнительные работы, лицо, заинтересованное в доработке единой технологии с учетом его потребностей, обязуется осуществлять финансирование этих работ, а лицо, осуществляющее от имени РФ распоряжение правом на единую технологию, обязуется заключить с лицом, заинтересованным в доработке единой технологии с учетом его интересов, договор об отчуждении права на единую технологию.

Следует также отметить экономическую составляющую договоров о передаче прав на единые технологии. Помимо общих требований, выдвигаемых ГК к условиям договора о передаче прав на единые технологии, ФЗ закрепляет в качестве существенного условия наличие и исполнение плана реализации единой технологии и ее практического применения. Неисполнение утвержденного плана является основанием для расторжения договора и лишения прав на технологии.

Таким образом, теоретически закреплены основные правовые процедуры передачи прав на технологии в частный сектор. Теперь должна начать формироваться практика данной реализации.

Еще один важный момент нашел свое отражение в новом зако-

нодательстве: секрет производства (ноу-хау) получит гарантированную правовую защиту на высшем законодательном уровне. Научно-техническая информация (не являясь результатом интеллектуальной деятельности) в ряде случаев не подлежит разглашению, или доступ к ней носит ограниченный характер. Так, информацией, составляющей коммерческую тайну, признается в т.ч. научно-техническая информация, которая имеет действительную или по-

ется гарантией для научной организации правомерности использования результатов интеллектуальной деятельности.

ГК РФ закрепляет исключительные права на служебные произведения (созданные в пределах выполнения трудовых обязанностей) за работодателем, если трудовым или иным договором, заключенным между работодателем и автором произведения, не установлено иное. Однако четвертая часть ГК РФ также

### Трудовые отношения, связанные с созданием охраноспособных объектов, требуют предельной формализации и детализации

тенциальную коммерческую ценность в силу неизвестности ее третьим лицам, к которой нет свободного доступа на законном основании и в отношении которой введен режим коммерческой тайны. К разряду ноу-хау как одной из разновидностей коммерческой тайны относятся сведения любого характера, в т.ч. о результатах интеллектуальной деятельности в научно-технической сфере. Исключительное право на ноу-хау принадлежит его обладателю и действует до тех пор, пока сохраняется режим конфиденциальности в отношении сведений, составляющих ноу-хау.

Мы рассмотрели, как распределяются права на результаты интеллектуальной деятельности между научной организацией и внешними контрагентами (государственными и/или обычными заказчиками).

#### **ПРАВА НА ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНУЮ СОБСТВЕННОСТЬ: РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ВНУТРИ НАУЧНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ**

Поскольку при создании объектов интеллектуальной деятельности задействован человеческий фактор, то необходимо теперь остановиться и на вопросе распределения прав на такие объекты внутри организации, т.е. между научной организацией и ее непосредственными работниками. Правильность оформления соответствующих отношений явля-

ввела ряд новых требований для работодателя для сохранения за ним исключительных прав на результаты труда работников.

В частности, работодатель обязан в течение трех лет со дня получения служебного произведения в свое распоряжение начать его использование, или передать исключительное право на него другому лицу, или сообщить автору о сохранении произведения в тайне – в противном случае исключительное право на это служебное произведение переходит автору.

За автором сохраняется право на получение вознаграждения как в случае использования произведения самим работодателем, так и при передаче работодателем исключительного права другому лицу и при принятии работодателем решения о сохранении служебного произведения в тайне.

Аналогично правилу с произведениями науки, созданными в рамках исполнения служебного задания, исключительные права на служебное изобретение, служебную полезную модель или служебный промышленный образец закрепляются за работодателем, если договором между ним и работником не установлено иное.

Работник обязан уведомить работодателя о факте создания охраноспособного результата. При этом работодателю выделяется срок, равный

четырем месяцам с момента уведомления, для подачи заявки на получение патента на свое имя, передачи права на подачу патента третьему лицу или принятия решения о сохранении факта создания результата в тайне.

За работником сохраняется право на получение вознаграждения, размер которого определяется договором сторон. Минимальные ставки вознаграждения устанавливаются Правительством РФ.

## Государство, позиционируя передачу институтам исключительных прав на разработки и вовлечение их в хозяйственный оборот, должно обеспечить правовые механизмы этой процедуры в полном объеме

По истечении срока, выделенного работодателю на принятие решения относительно использования прав на созданный результат, право на подачу патента переходит к работнику.

Поскольку охраноспособный объект возникает в ходе выполнения автором своих трудовых обязанностей, то между работодателем и автором (работником) обязательно должен быть заключен трудовой договор. Вопросы, связанные с созданием, использованием результатов интеллектуальной деятельности, распределением прав, порядком выплаты вознаграждения и т.д., могут как найти свое отражение непосредственно в трудовом договоре, так и быть предметом отдельного договора.

Если же стороны решили заключить единый трудовой договор, который будет содержать в себе необходимые элементы авторского договора, то необходимо обратить внимание на следующие моменты.

Во-первых, трудовой договор может быть срочным и прекратить свое действие до момента истечения трехгодичного периода, выделенного законодателем для возможности работодателя начать использовать служебное произведение. Поэтому стороны должны зафиксировать в трудовом договоре, какие его разделы сохраняют свою силу после прекращения действия са-

мого договора, или заключить новый договор, который будет регулировать порядок взаимодействия сторон по вопросам использования охраноспособных объектов.

Во-вторых, автор имеет право на получение вознаграждения в случае использования созданного им произведения работодателем или иными лицами. Трудовое законодательство устанавливает обязанность работодателя по выплате заработной платы своим работникам. Это два разных

типа вознаграждения, которые могут отличаться друг от друга по размеру, по методу расчета, форме, условиям и порядку выплаты и т.д. Поэтому трудовой договор должен четко определять механизм начисления и выплаты указанных типов вознаграждения.

В-третьих, четвертая часть ГК РФ определяет служебное произведение как «...созданное в пределах установленных для работника (автора) трудовых обязанностей». Это требует закрепления в трудовом договоре перечня трудовых обязанностей работников. Целесообразно прописать их предельно точно (можно вынести в приложение к трудовому договору должностную инструкцию, научный план), указав при этом, в какой форме могут даваться те или иные задания, кто может ставить задачи работнику, в какой форме должны представляться отчеты и результаты, как обеспечивается работником хранение личной документации в целях ее неотжествления со служебной, пределы использования работником материально-технической базы работодателя и т.д. Рекомендуемая точность позволит устранить возможные споры сторон относительно прав и/или обязанностей по отношению к конкретному охраноспособному объекту.

В-четвертых, трудовой договор должен обеспечивать механизм

увольнения работников, максимально защитив при этом интересы сторон. Достаточно распространенной является ситуация, когда берутся на работу или увольняются работники, имеющие определенные идеи, методики и наработки. Сами по себе эти элементы не являются охраноспособными. Но они являются основой уже созданных или планируемых в будущем произведений. Поэтому при решении вопроса о распределении прав на те или иные результаты интеллектуальной деятельности стороны должны учитывать и порождаемые обязанности, и степень ответственности, включая возможность привлечения к ней виновной стороны.

В-пятых, необходимо уделить внимание вопросу соавторства, поскольку большая часть объектов создается в результате совместного творчества лиц. Для работодателя это в первую очередь порядок распределения доходов между лицами-соавторами. А для самих соавторов необходимо урегулировать (уже в рамках самостоятельного договора) вопросы дальнейшего использования результатов интеллектуальной деятельности в случае перехода к ним исключительного права.

Впрочем, вышеперечисленные моменты не являются полным списком «подводных камней» вопроса взаимодействия работодателя и автора в ходе создания служебного произведения. Важно одно – трудовые отношения, связанные с созданием охраноспособных объектов, требуют предельной формализации и детализации.

Мы рассмотрели, как возникают права у научной организации на результаты интеллектуальной деятельности при взаимодействии с внешними контрагентами (государственными и обычными заказчиками) и внутренними (цепочка работодатель-сотрудник).

### НАУЧНЫЕ ОРГАНИЗАЦИИ И ИХ ДОХОДЫ ОТ ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ: ВОЗМОЖНОСТИ И ОГРАНИЧЕНИЯ

Теперь остановимся на вопросе определения границ возможностей получения научной организацией дохода от своих нематериальных активов.

Степень свободы научной организации в вопросе распоряжения ре-

зультатами научной деятельности зависит от многих факторов, в частности: от типа научной организации, ее организационно-правовой формы, вида финансирования работ, характера создаваемого объекта и пр.

В настоящее время основная масса научных организаций представлена в форме государственных унитарных предприятий и государственных учреждений. Несмотря на то, что законодательство допускает существование научных организации и в форме хозяйственных обществ, процент таких организаций на текущий момент достаточно мал.

В связи с принятием Федерального закона от 3 ноября 2006 г. № 174-ФЗ «Об автономных учреждениях» начался процесс создания и преобразования научных организаций в форму автономных учреждений, но практика функционирования таких организаций пока еще мала.

Какие же возможности предоставлены научным организациям в плане использования и распоряжения имеющимся у них имуществом (включая имущественные права) согласно их организационно-правовой форме? Их несколько, в зависимости от ведомственной принадлежности научных коллективов. Рассмотрим ведомства, в структуру которых входит та или иная научная организация, и их возможности.

**Государственное унитарное предприятие, основанное на праве хозяйственного ведения** (коммерческая организация):

- может самостоятельно распоряжаться (продавать, сдавать в аренду, отдавать в залог и пр.) закрепленным за ним или приобретенным имуществом за исключением недвижимого;
- вопрос об участии в коммерческой или некоммерческой организации, а также возможность распоряжаться вкладом (акциями) в уставном капитале хозяйственного общества, товарищества или АО могут быть приняты только с согласия собственника имущества унитарного предприятия.

**Государственное унитарное предприятие, основанное на праве оперативного управления** (коммерческая организация):

- распоряжение имуществом производится только по согласованию с собственником;

– не имеет права учреждать иные юридические лица и входить в их состав.

**Учреждение** (некоммерческая организация):

- распоряжение имуществом, закрепленным собственником, а также имуществом, приобретенным за счет средств, выделенных ему по смете, производится только по согласованию с собственником;

– может самостоятельно распоряжаться доходами, полученными от коммерческой деятельности, предусмотренной его учредительными документами, и приобретенным за счет этих доходов имуществом;

– не имеет права учреждать другие юридические лица и входить в их состав.

**Автономное учреждение** (некоммерческая организация):

– движимым имуществом, за исключением особо ценного, вправе распоряжаться самостоятельно;

– вправе вносить денежные средства и иное имущество в уставный (складочный) капитал других юридических лиц или иным образом передавать это имущество другим юридическим лицам в качестве их учредителя или участника только с согласия своего учредителя.

**Российская академия наук** (некоммерческая организация):

– в отношении федерального имущества наделена правом владения, пользования и распоряжения;

– наделена правом создания, реорганизации и ликвидации подведомственных организаций;

– может выступать учредителем или соучредителем организаций, служащих уставным целям и задачам РАН, а также вступать в ассоциации и союзы.

**Институты РАН** (некоммерческие организации):

– владеют, пользуются и распоряжаются федеральным имуществом, закрепленным за ними РАН и переданным им в оперативное управление. Доходы от разрешенной их уставами деятельности и имущество, приобретенное за счет таких доходов, поступают в их самостоятельное распоряжение и учитываются на отдельном балансе.

На данный момент наиболее распространенной формой реализа-

ции научной деятельности является учреждение. Большую часть среди них составляют академические структуры – институты, входящие в состав РАН.

Основная часть научной деятельности института ведется в соответствии с бюджетным сметным финансированием, в т.ч. в рамках исполнения государственных контрактов.

Рассмотрим, как создаются охраноспособные объекты в рамках научной организации (на примере научной организации).

Институт может как выступать головным исполнителем государственного контракта (с привлечением соисполнителей или без таковых), так и выполнять функции соисполнителя. Нас будет интересовать первый случай, поскольку именно у головного исполнителя локализуется максимальный объем прав на итоговый результат.

В ходе выполнения государственного контракта институт как головной исполнитель совместно с соисполнителями проводит комплекс работ, результатом которых достаточно часто является комплексный объект, который может включать в себя в том или ином сочетании различные охраноспособные и не подлежащие правовой охране объекты интеллектуальной деятельности. При этом могут быть задействованы результаты интеллектуальной деятельности самого института и третьих лиц – как официальных соисполнителей по государственному контракту, так и иных лиц.

В состав охраноспособных объектов института могут входить как те объекты, права на которые переданы институту РАН (т.е. исключительные права на которые закреплены за государством), так и результаты интеллектуальной деятельности, исключительные права на которые принадлежат непосредственно институту.

При этом государственный контракт, как правило, допускает возможность включения в состав полученных результатов объектов интеллектуальной деятельности третьих лиц при условии соблюдения прав законных правообладателей таких объектов. Иначе говоря, отношения между институтом и соисполнителями должны оформляться отдельными

договорами (договор на выполнение НИОКР, договор возмездного оказания услуг, лицензионный договор о предоставлении прав на соответствующие результаты интеллектуальной деятельности и пр.)

В рамках таких договоров между институтом и компаниями-обладателями прав на задействованные для реализации государственного контракта результаты интеллектуальной деятельности последние передают институту исключительное право или право использования принадлежащих им прав на необходимые объекты. Если речь идет о передаче прав использования, то важен объем этих прав, поскольку он должен быть достаточен для исполнения головным исполнителем своих обязанностей по государственному контракту, включая последующую передачу прав государственному заказчику. Аналогичные требования относительно срока и территории использования передаваемых прав.

Как мы уже говорили выше, текст государственного контракта содержит общие нормы закона. Однако в итоговом акте сдачи-приемки работ не отражается, на какие результаты интеллектуальной деятельности и в каком объеме закрепляются права за исполнителем и РФ, как осуществляется дальнейшее взаимодействие между исполнителем, государственным заказчиком и третьими лицами в вопросах использования результатов научной деятельности. Избежать неопределенности в данном вопросе возможно следующим образом:

- путем заключения соглашения между государственным заказчиком и институтом (а также, в случае необходимости, между институтом и соисполнителями) о порядке совместного использования и распоряжения правом на созданный результат;

- в акте сдачи-приемки работ, выполняемых в рамках государственно-

го контракта, детально прописывать, права на какие объекты и в каком объеме подлежат передаче и/или закреплению за той или иной стороной.

Но надо отметить, что сам подход к составлению комплекта документации, сопровождающего государственный контракт, очень консервативный и негибкий. Внесение изменений и/или дополнений в него или невозможно, или требует больших временных затрат.

### **НАУЧНЫЕ ИНСТИТУТЫ И ИХ ПРАВА НА ПРОДУКЦИЮ, ПОЛУЧЕННУЮ В РАМКАХ ГОСКОНТРАКТОВ**

Резюмируя вышесказанное, получаем следующую картину. В ходе исполнения работ по государственному контракту институт:

- а) явным образом приобретает исключительное право на созданные результаты интеллектуальной деятельности (что находит свое отражение в его бухгалтерском и налоговом учете, а также получении охраняемых и правоустанавливающих документов). Институт имеет основания для последующего распоряжения соответствующими правами на основании договора с государственным заказчиком;

- б) имеет некий продукт (результат разработок, набор компонент, явно не предусмотренных государственным контрактом), который никаким образом не отражен в его балансе (или не отражен как НМА). Имеет подписанный акт о выполнении и сдаче работ по государственному контракту, из содержания которого нет однозначного понимания, как распределены права в силу причин, описанных выше.

Для дальнейшей коммерциализации готового результата необходимы полномочия по его распоряжению. Они будут следовать из договора о передаче институту исключительного права, определяться с учетом всех условий, предусмотренных госу-

дарственным контрактом, договорами с соисполнителями и правообладателями, уставом института, соглашениями с РАН о передаче имущества и реестрами переданного имущества. Необходимость учета всех этих документов объясняется тем, что итоговый результат создается с использованием имущества и/или имущественных прав третьих лиц, которые могут налагать дополнительные условия использования.

Институт является учреждением, т.е. имущество, закрепленное за ним собственником (в лице РАН), а также имущество, приобретенное за счет средств, выделенных ему по смете, и произведенная с использованием закрепленного имущества и/или выделенных средств продукция находятся у института в оперативном управлении, и, следовательно, институт не наделен правом распоряжения в отношении этого имущества. А вот отдельными продуктами, созданными за свой счет при выполнении тех же НИОКР, но прямо не предусмотренными государственным контрактом, институт имеет право распоряжаться самостоятельно.

Государство, позиционируя передачу институтам исключительных прав на разработки и вовлечение их в хозяйственный оборот, должно обеспечить правовые механизмы этой процедуры в полном объеме, в частности, обеспечить процесс реорганизации научных организаций, предусмотреть возможность участия научных организаций в уставном капитале иных организаций и пр. Что же касается научного сектора, то руководителям научных организаций следует уделить большее внимание вопросу идентификации, учету нематериальных активов, обеспечению наличия охраноспособных и правоустанавливающих документов в целях повышения инвестиционной привлекательности своих нематериальных активов. ●

# Живые системы в России: взгляд сквозь призму научных публикаций

В. В. Сычёв<sup>1#</sup>, А. В. Колесниченко<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ООО «Парк-медиа», Москва

<sup>2</sup> Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения РАН

# e-mail: vsychev@strf.ru

**Интенсивно развивающиеся области науки требуют объективных оценок, позволяющих судить об эффективности работ, в них выполняемых. Существуют различные критерии, позволяющие оценивать эффективность работы как отдельных ученых, так и целых научных институтов. В конечном итоге, можно оценивать уровень развития научных исследований отдельных государств.**

**О**чевидный способ определения квалификации и активности исследователей – наличие у них публикаций по теме исследования. Это касается как отдельных специалистов, так и целых научных центров. Такой подход имеет очевидные преимущества.

Во-первых, он наиболее объективный – публикации являются самым распространенным и общепринятым продуктом научной работы, именно в них находят отражение и распространяются в мире результаты поисковой деятельности ученых.

Во-вторых, публикационная активность легко считается, особенно в по-

следние годы, с появлением новых крупных баз данных научных публикаций. При этом заметим, что разные системы подсчета индексируют разные научные издания и поэтому дают подчас разные данные, однако по России серьезных расхождений в цифрах и динамике нет.

В связи с этим был проведен анализ публикационной активности (ПА) российских исследователей, работающих по приоритетному направлению «Живые системы», в период с 1996 по 2008 гг. с использованием международной базы данных БД SCOPUS. «Живые системы» – формально второе направление по объему финан-

сирования (следом за нанотехнологиями), но занимающее первое место с точки зрения обеспечения качества жизни населения страны. Целью анализа было выявление тех областей направления «Живые системы», в которых работы в России ведутся наиболее интенсивно, при этом уровень этих работ должен быть достаточно высоким. В ходе исследования не только изучалось количество публикаций, но и выявлялись институты и научные центры – лидеры исследований в различных областях, способные стать своеобразными «центрами кристаллизации» работ в области живых систем в России.

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовались данные, содержащиеся в международной базе данных SCOPUS. Реферативная база данных Scopus ([www.scopus.com](http://www.scopus.com)) представляет собой крупнейшую в мире единую реферативную базу данных, которая индексирует более 15 000 наименований научно-технических и медицинских публикаций примерно 4000 междуна-

родных издательств. На сегодняшний день в БД SCOPUS представлены более 300 российских научных журналов.

Анализу подвергались не все области наук о живом, а лишь те, результаты работ в которых имеют ярко выраженное прикладное значение. Выбор этих областей не представлял затруднений: мы исходили из утвержденных в мае 2006 г. Президентом РФ приоритетных направлений развития науки, технологий и техники в Российской Федерации. Они, напомним, включают в себя:

- безопасность и противодействие терроризму,
- живые системы,
- индустрию наносистем и материалов,
- информационно-телекоммуникационные системы,
- перспективные вооружения, военную и специальную технику,
- рациональное природопользование,
- транспортные, авиационные и космические системы,
- энергетику и энергосбережение.

21 мая 2006 г. Президентом РФ был утвержден перечень из 34 критических технологий Российской Федерации, часть из которых относится к разделу «живые системы». Перечень критических технологий Российской Федерации в области «Живые системы» включает в себя следующие проанализированные в данной работе критические технологии:

- биоинформационные технологии, биокаталитические, биосинтетические и биосенсорные технологии, биомедицинские и ветеринарные технологии жизнеобеспечения и защиты человека и животных, геном-

- клеточные технологии,
- технологии биоинженерии, технологии создания биосовместимых материалов.

Таким образом, для исследования были выбраны именно эти семь критических технологий. Используя набор ключевых слов для поиска, подсчитывали общее количество статей, ежегодно публиковавшихся отечественными авторами как в российских, так и в зарубежных научных журналах, представленных в БД SCOPUS, отдельно для каждой критической технологии. Каждый перечень ключевых слов обязательно сопровождался аффилиацией «Russia».

Заметим, что немалая часть работ выполняется не только в отдельных научных коллективах, а и в рамках междисциплинарных проектов, выполняемых научными консорциумами, в которые входят различные институты. Эти данные также учитывались в ходе исследования.

**РОССИЯ НА ФОНЕ МИРОВЫХ ЛИДЕРОВ В ОБЛАСТИ НАУК О ЖИВОМ**

Если рассматривать публикации в биологии в мире за 1996-2008 гг., то вырисовывается следующая картина (рис. 1а, б).

Безусловным лидером по публикационной активности являются США: в этот промежуток времени ПА возросла со 192 до 251 тыс. статей в год.

В то же время наиболее активные в области науки страны Евросоюза (Великобритания, Германия, Франция, Италия) также демонстрировали тенденцию к росту (впрочем, для Великобритании и Германии она смени-

лась некоторым снижением в последние два-три года). Из этих четырех стран наибольшего увеличения числа публикаций добилась Италия: за 12 лет число публикаций, авторами которых были итальянские ученые, возросло в 1.6 раза и достигло 35 тыс. статей в год. Незначительный рост числа статей по биологии демонстрирует Швейцария (с 8.8 до 13.7 тыс. статей).

Отдельного внимания заслуживает рост числа статей, опубликованных учеными из стран, входящих в группу государств под аббревиатурой БРИК (Бразилия, Россия, Индия, Китай), которые эксперты относят к странам с растущей экономикой. Впрочем, с точки зрения развития науки гораздо уместнее вести речь о группе из трех государств – Россия, как видно из графика, выпадает из этой четверки.

Если в 1996 г. Россия, Китай и Бразилия имели почти равные стартовые позиции – (6.4, 6.2 и 5 тыс. статей соответственно), то в следующем году картина резко изменилась прежде всего за счет беспрецедентного увеличения числа статей китайских авторов (57.4 тыс. статей в 2008 г. – Китай в настоящее время занимает четвертое место в мире по количеству статей по биологии, обгоняя даже Германию), а Бразилия выпустила 19 тыс. статей в 2008 г. Индия все годы наращивала ПА, выйдя с 11 тыс. статей в 1996 г. на уровень почти 26 тыс. статей в 2008 г. – и восьмое место в списке стран. Поначалу небольшой, а в последние годы заметный рост демонстрировала и Бразилия, обогнавшая по числу публикаций Швейцарию (13.7 тыс. статей в 2008 г.). За 12 лет в пять раз выросло число публикаций авторов из Южной Кореи: с 3.3 до 16.7 тыс. статей.

Рис. 1. а) Общее число публикаций по биологии в период с 1996 по 2008 гг. б) Общее число публикаций по биологии в период с 1996 по 2008 гг. (без учета США)

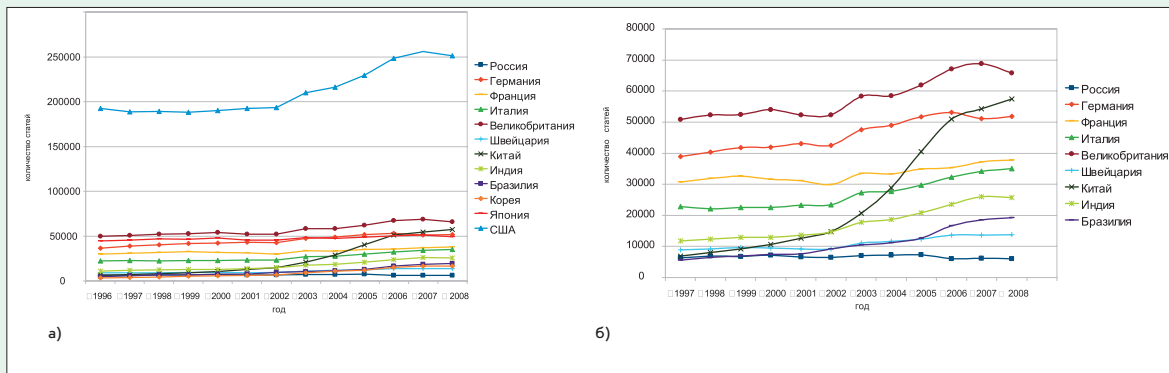


Рис. 2. Количество статей российских исследователей в области биоинформационных технологий

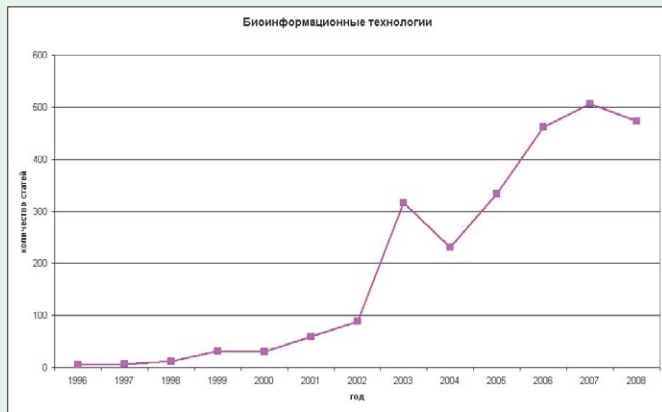
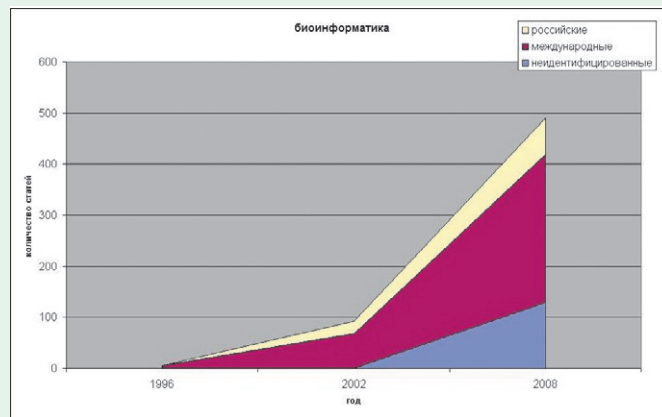


Рис. 3. Соотношение между количествами статей российских авторов в области биоинформационных технологий, опубликованных в российских и международных журналах



И лишь Россия на фоне роста ПА Китая, Индии и Бразилии демонстрирует (после незначительного подъема ПА в 2000-2003 гг.) свой особый путь, а именно – тенденцию к рецессии (снижение с 6.4 до 5.9 тыс. статей в год).

Рассмотрим подробнее структуру публикационной активности российских авторов в каждой из областей живых систем, относящихся к критическим технологиям.

### БИОИНФОРМАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

Биоинформационные технологии являются относительно новым разделом наук о жизни, стремительно развивающимся во всем мире. Бурный рост работ в этом направлении обусловлен необходимостью обработки огромных массивов информации, накопленной в ходе биологических экспериментов.

Российская биоинформатика в данном случае не является исключением. С конца девяностых годов, когда работы в данной области у нас в стране исчислялись единицами, их число выросло до 500 статей в год. Хотя в по-

следний год и наблюдается снижение скорости прироста публикационной активности, в данной области наблюдается наиболее сильный прогресс исследований (рис. 2). Ключевыми словами для поиска были «bioinformatics», «comparative genomics», «computational».

Работы в данной области проводятся на высоком международном уровне, публикуются в основном в международных англоязычных журналах, таких как «Bioinformatics», «Nucleic Acids Research», «Journal of Bioinformatics and Computational Biology», «Molecular Phylogenetics and Evolution», «Journal of Molecular Biology», «In Silico Biology», «BMC Genomics», «BMC Bioinformatics», «BMC Evolutionary Biology». Из российских журналов наиболее часто работы по биоинформатике публиковались в таких журналах, как «Биохимия», «Молекулярная биология», «Биофизика», «Генетика», «Доклады РАН».

По данным БД SCOPUS, среднее число соавторов в 2008 г. в данной области исследований в одной статье составляло 7 человек, среднее число

опубликованных одним сотрудником в 2008 г. работ в данной области – 3 статьи, соответственно, число активно работающих в данной области научных сотрудников можно грубо оценить как не более 1000 человек.

Среди институтов РАН можно выделить такие, как Институт цитологии и генетики СО РАН (84 статьи), Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта (82), Институт математики им. С. Л. Соболева СО РАН (69), Институт цитологии (40), Институт проблем передачи информации (38).

В составе РАМН исследования в данной области ведутся менее активно, большинство из них выполнены в Институте биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича (37), ряд работ ведется в Российском онкологическом научном центре им. Н. Н. Блохина (16), Институте эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи (13), Институте вирусологии им. Д. И. Ивановского (11).

Среди государственных научных центров вне конкуренции ФГУП ГНЦ ГосНИИГенетика (102 статьи), далее – НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ (42), Объединенный институт ядерных исследований (г. Дубна, 27).

Безусловный лидер из числа ВУЗов – Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова (448 статей), следом со значительным отрывом располагаются Санкт-Петербургский государственный университет (67), Новосибирский государственный университет (57), Санкт-Петербургский государственный политехнический университет (33).

Таким образом, биоинформационные технологии в настоящее время активно развиваются (число публикаций в 2002-2008 гг. выросло практически в 5 раз), работы в области данной критической технологии проводятся на достаточно высоком уровне, подавляющее большинство статей публикуется в международных журналах (рис. 3). Но это вполне объяснимо: биоинформатика не требует дорогостоящего лабораторного оборудования и реагентов. Компьютеры и программное обеспечение – вот основной инструмент биоинформатиков. Те же области живых систем, что непосредственно связаны с работой за лабораторными столами, в плане публикаци-

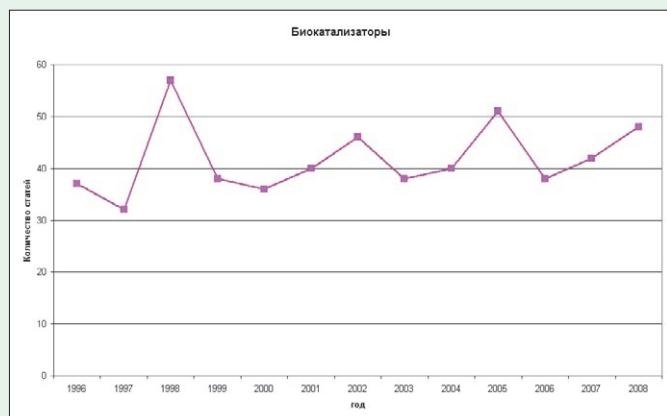


Рис. 4. Количество статей российских исследователей в области технологий биокатализа

онной активности представлены куда скромнее.

### БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЕ, БИОСИНТЕТИЧЕСКИЕ И БИОСЕНСОРНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

Данный раздел критических технологий живых систем состоит из трех достаточно независимых подразделов, в связи с чем их необходимо проанализировать каждый по отдельности.

#### БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

Биокаталитические технологии среди академий наук наиболее активно разрабатываются в институтах РАН и РАМН. Но число публикаций по данной тематике, включенных в БД SCOPUS, стабильно колеблется в пределах от 40 до 50 работ в год, не проявляя тенденции к росту (рис. 4). Ключевыми словами для поиска были «biocatalysis», «enzymatic», «catalysis».

Работы, сделанные нашими учеными в данной области, публикуются в основном в российских журналах, таких как «Биохимия», «Микробиология», «Биоорганическая химия», «Успехи химических наук». Но немалая часть работ публикуется в международных журналах: «FEBS Letters», «Biotechnology and Bioengineering», «Biocatalysis and Biotransformation», «Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic».

По данным БД SCOPUS, среднее число соавторов в 2008 г. в данной области исследований в одной статье составляло 5 человек, среднее число опубликованных одним сотрудником в 2008 г. работ в данной области – 1.2 статьи, соответственно, число активно работающих в данной области научных сотрудников можно грубо оценить

как около 200 человек.

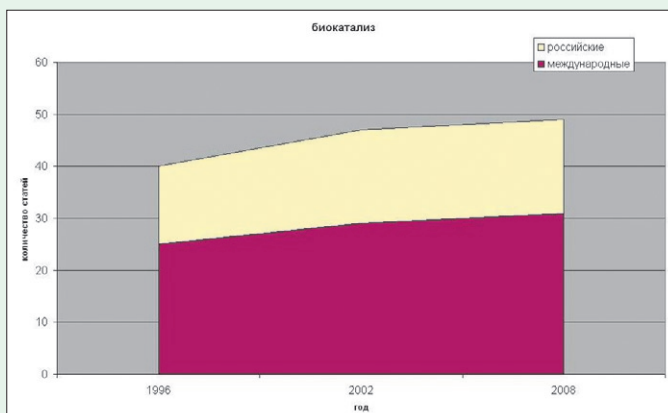
Анализ организаций, в которых научные сотрудники наиболее активно работают в данной области, показал, что среди НИИ и ГНЦ исследования в этом направлении велись в ФГУП ГНЦ ГосНИИГенетика (12 статей) и НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе (8).

Среди институтов РАН наибольшая публикационная активность в данной области отмечена у Института катализа им. Г. К. Борескова СО РАН (23 статьи), Института органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН (19), Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрябина РАН (12).

Из институтов РАМН исследования в данной области проводились в Институте биомедицинской химии РАМН (12 статей) и Всероссийском кардиологическом научном центре РАМН (7).

Среди высших учебных заведений наиболее активно исследования проводились в МГУ им. М. В. Ломоносова (175 статей), остальные ВУЗы имеют лишь единичные публикации.

Рис. 5. Соотношение между количествами статей российских авторов в области технологий биокатализа, опубликованных в российских и международных журналах



В целом, публикационная активность российских ученых в области технологий биокатализа весьма низка. Однако, заметим, почти 60 % статей по этой теме публикуется в международных журналах (рис. 5), что говорит о достаточно высокой квалификации исследователей, работающих в данной области.

### БИОСИНТЕТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

Биосинтетические технологии разрабатываются гораздо более активно, что связано, по-видимому, с тем, что они более «старые» в плане истории этих работ в нашей стране. Но здесь число публикаций (которых на порядок больше, чем в технологиях биокатализа), не только колеблется в определенном «коридоре», но и несколько снизилось за последние три года (рис. 6). Ключевыми словами для поиска были «biosynthesis», «synthesis».

Работы российских ученых в данной области в основном публикуются в российских же журналах, таких как «Микробиология», «Биохимия», «Бюллетень экспериментальной биологии и медицины», «Генетика», «Молекулярная биология». Некоторая часть работ российских исследователей, выполненных в этой области, публикуется, в частности, в таких международных журналах, как «FEBS Letters», «Pharmaceutical Chemistry Journal», «Journal of Biological Chemistry», «Biophysics».

По данным анализа БД SCOPUS, среднее число соавторов в 2008 г. в данной области исследований в одной статье составляло 5 человек, среднее число опубликованных одним сотрудником в 2008 г. работ в данной



области – 2,58 статьи, соответственно, число активно работающих в данной области научных сотрудников можно приблизительно оценить в 700 человек.

Анализ организаций, в которых научные сотрудники наиболее активно работают в данной области, показал, что среди институтов РАН наибольшая публикационная активность в данной области отмечена у следующих организаций: Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина (228 статей), Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта (206), Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского (178), Института физиологии растений им. К. А. Тимирязева (171), Институт молекулярной генетики (109).

Из институтов РАМН наиболее активно исследования в данной области проводились в Институте эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи (191).

Среди высших учебных заведений наиболее активно исследования в области технологий биосинтеза проводились в МГУ (997 статей), а также СПбГУ (129), Московской медицинской академии им. И. М. Сеченова (90), Казанском государственном университете (84), Московской академии тонких химических технологий им. М. В. Ломоносова (59).

Биосинтетические технологии – пожалуй, единственные из всех критических технологий, в которых столь однозначно наблюдается спад публикационной активности за 2002-2008 гг., хотя в период 1996-2002 гг. отмечался некоторый рост. Несмотря на рост числа публикаций в международных журналах, произошедший к 2008 г. (рис. 7), в этот период произошло существенное падение числа публикаций в российских журналах.

### ТЕХНОЛОГИИ БИОСЕНСОРОВ

Технологии биосенсоров – довольно новое направление технологий живых систем, активно развивающееся во всем мире. Число публикаций по данной тематике российских ученых, включенных в БД SCOPUS, за последние годы выросло в 2 раза – с 80 до 160 работ в год (рис. 8). Ключевыми словами для поиска были «biosensor», «biochip», «biomarker».

Рис. 6. Количество статей российских исследователей в области технологий биосинтеза

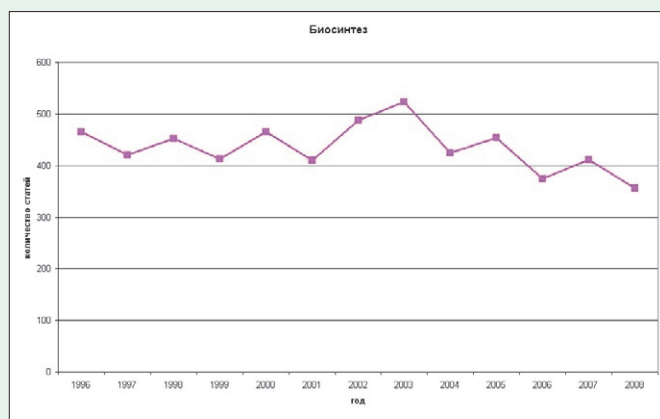


Рис. 7. Соотношение между количествами статей российских авторов в области технологий биосинтеза, опубликованных в российских и международных журналах

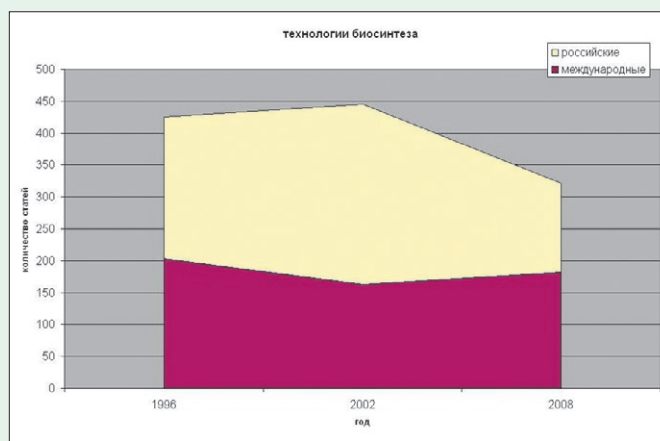
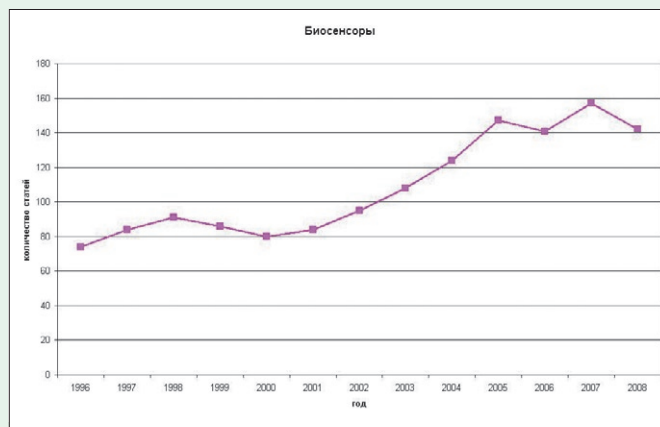


Рис. 8. Количество статей российских исследователей в области биосенсорных технологий

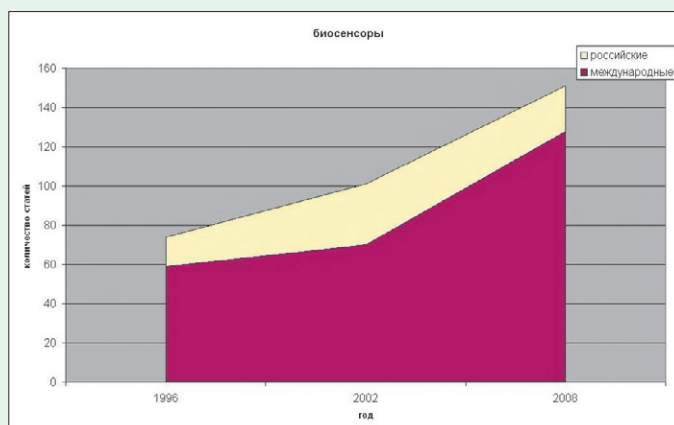


Работы российских ученых в данной области в основном публикуются в международных журналах, таких как «Biosensors and Bioelectronics», «Journal of Analytical Chemistry», «Bioelectrochemistry», «Analytical Letters», «Biomedical Engineering». Часть работ российских исследователей, выполненных в этой области, публикуется в таких российских журналах, как «Прикладная биохимия и микробиология», «Биохимия», «Молекулярная биология».

По данным анализа БД SCOPUS, среднее число соавторов в 2008 г. в данной области исследований в одной статье составляло 4,7 человек, среднее число опубликованных одним сотрудником в 2008 г. работ в данной области – 1,6 статьи, соответственно, число активно работающих в данной области научных сотрудников можно приблизительно оценить в пределах 400 человек.

Анализ организаций, в которых научные сотрудники наиболее ак-

Рис. 9. Соотношение между количествами статей российских авторов в области биосенсорных технологий, опубликованных в российских и международных журналах



тивно работают в данной области, показал, что среди институтов РАН наибольшая публикационная активность в данной области отмечена у Института молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН (49 статей), Института общей физики им. А. М. Прохорова (33), Института кристаллографии им. А. В. Шубникова (31), Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина (17), Института проблем химической физики (15).

Из институтов РАМН наиболее активно исследования в данной области проводились в Институте биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича (74 статьи).

Среди высших учебных заведений наиболее активно исследования в области технологий биосинтеза проводились в МГУ им. М. В. Ломоносова (362 статьи), Казанском государственном университете (87), Санкт-Петербургском государственном университете (65).

По данным анализа публикационной активности российских ученых, технологии биосенсоров являются од-

ними из самых быстроразвивающихся критических технологий. С 2002 по 2008 г. публикационная активность российских ученых по данной тематике увеличилась в 1.5 раза, причем в основном за счет увеличения числа публикаций в международных журналах (рис. 9).

Оценивая состояние дел в области критических технологий данных направлений в целом, можно сделать вывод, что, хотя технологии биосенсоров интенсивно развиваются, в технологиях биокатализаторов отмечается стагнация, а в технологиях биосинтеза – явный спад, связанный, по-видимому, с недостаточным вниманием и финансированием данной области.

### БИОМЕДИЦИНСКИЕ И ВЕТЕРИНАРНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ЖИЗНЕОБЕСПЕЧЕНИЯ И ЗАЩИТЫ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

Биомедицинские и ветеринарные технологии были также проанализированы по отдельности, поскольку в БД SCOPUS достаточно легко и точно вычлняются журналы соответствующей направленности.

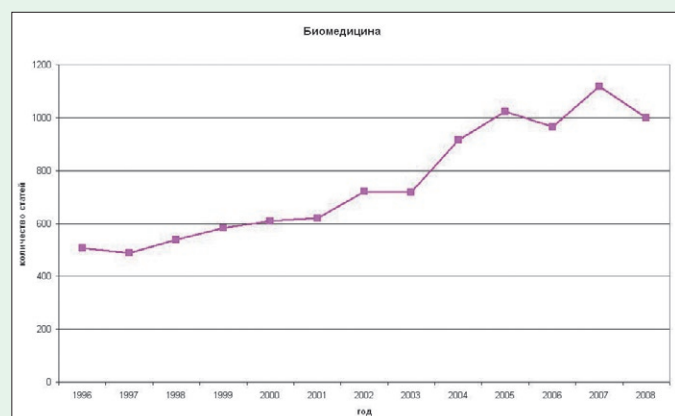


Рис. 10. Количество статей российских исследователей в области биомедицинских технологий и технологий жизнеобеспечения и защиты человека

### БИОМЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ ЖИЗНЕОБЕСПЕЧЕНИЯ И ЗАЩИТЫ ЧЕЛОВЕКА

Биомедицинские технологии жизнеобеспечения разрабатываются уже в течение длительного промежутка времени. Число публикаций по данной тематике, включенных в БД SCOPUS, за последние 12 лет выросло с 500 работ в 1996 г. до более чем 1000 в 2007 г., однако в 2008 г. отмечается некоторое снижение числа опубликованных работ (рис. 10).

Работы российских ученых в данной области в основном публикуются в российских же журналах, таких как «Биомедицинская химия», «Биомедицинская техника», «Медицинская техника», «Бюллетень экспериментальной биологии и медицины», «Вопросы медицинской химии», «Медицинская радиология», «Генетика», «Прикладная биохимия и микробиология» и ряде других. Некоторая часть работ российских исследователей, выполненных в этой области, публикуется в таких международных журналах, как «Journal of Biological Chemistry», «Human Physiology», «Pharmaceutical Chemistry Journal», «Biomedica Biochimica Acta», «Critical Reviews in Biomedical Engineering», «Journal of Biomedical Optics» и большом числе других журналов.

По данным анализа БД SCOPUS, среднее число соавторов в 2008 г. в данной области исследований в одной статье составляло 5.6 человек, среднее число опубликованных одним сотрудником в 2008 г. работ в данной области – 3.69 статьи, соответственно, число активно публикующихся в данной области научных сотрудников можно приблизительно оценить в пределах 1700 человек.

Анализ организаций, в которых научные сотрудники наиболее активно работают в данной области, показал, что среди институтов РАМН наиболее активно исследования в данной области проводились в Институте биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича (711 публикаций), Всероссийском кардиологическом научном центре (97) и Российском онкологическом научном центре им. Н. Н. Блохина (97).

Из институтов РАН наибольшая публикационная активность в данной области отмечена у Института био-

медицинских проблем (471 публикация), следом идут Институт общей физики им. А. М. Прохорова (107), Институт прикладной физики РАН (100), Институт химической физики им. Н. Н. Семенова (98).

Среди высших учебных заведений наиболее активно исследования проводились в МГУ им. М. В. Ломоносова (1282 статьи), Московской медицинской академии им. И. М. Сеченова (166), Санкт-Петербургском государственном университете (159), Российском государственном медицинском университете (136).

Из числа научных организаций, относящихся к ведомственным структурам, работы в области биомедицинских технологий жизнеобеспечения и защиты человека выполнялись в таких организациях, как Всероссийский научно-исследовательский институт витаминов (118 статей), ФГУП ГНЦ Государственный оптический институт им. С. И. Вавилова (39), Объединенный институт ядерных исследований (38), Научно-практический центр медицинской радиологии (37).

Вообще, биомедицинские технологии относятся к числу активно развивающихся технологий живых систем. За 2002-2008 гг. число статей в данной области увеличилось более чем на 30 % и достигло 70 % от общего числа статей по направлению «медицина», зарегистрированных в базе данных БД SCOPUS. В этот период времени особенно сильно росло число статей, опубликованных по данной тематике в международных журналах (рис. 11). Это направление активно развивается как в институтах Российской академии медицинских наук, так и в профильных институтах РАН, институтах Министерства здравоохранения и социального развития и медицинских высших учебных заведениях.

### ВЕТЕРИНАРНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ЖИЗНЕОБЕСПЕЧЕНИЯ И ЗАЩИТЫ ЖИВОТНЫХ

Ветеринарные технологии также разрабатываются в Российской Федерации довольно давно. Число публикаций по данной тематике, включенных в БД SCOPUS, на протяжении последних 12 лет выросло практически в 2 раза – со 100 до около 200 работ в год, однако в последние годы отмечается

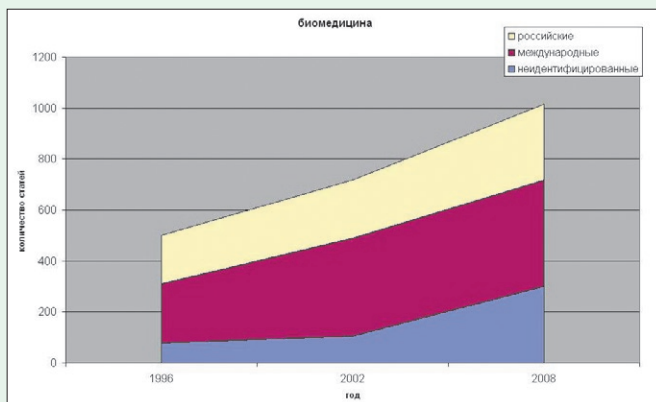


Рис. 11. Соотношение между количествами статей российских авторов в области биомедицинских технологий и технологий жизнеобеспечения и защиты человека, опубликованных в российских и международных журналах

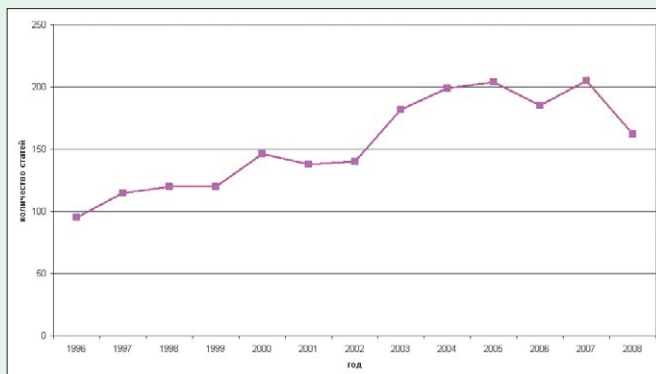


Рис. 12. Количество статей российских исследователей в области ветеринарных технологий жизнеобеспечения и защиты животных

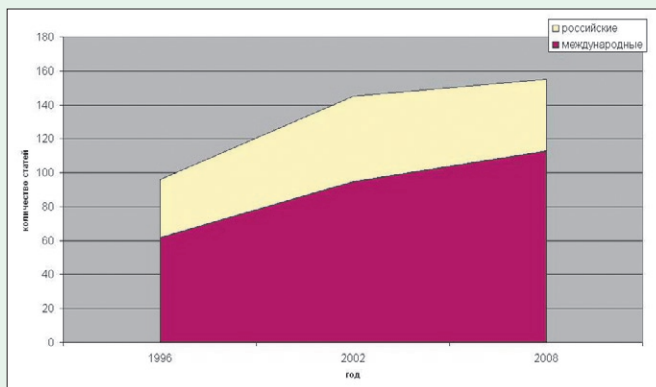


Рис. 13. Соотношение между количествами статей российских авторов в области ветеринарных технологий жизнеобеспечения и защиты животных, опубликованных в российских и международных журналах

некоторое снижение числа опубликованных работ (рис. 12).

Работы российских ученых в области ветеринарных технологий жизнеобеспечения и защиты животных публикуются в основном в российских журналах, таких как «Радиобиология», «Бюллетень экспериментальной биологии и медицины», «Радиационная биология и радиэкология», «Биологический бюллетень», «Фармакология и токсикология», «Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии», «Вопросы вирусологии». Небольшая часть работ российских исследователей, выполненных в этой области, публикует-

ся в таких международных журналах, как «Pharmaceutical Chemistry Journal», «Neuroscience and Behavioral Physiology», «Vaccine», «Journal of Biological Chemistry».

По данным анализа БД SCOPUS, среднее число соавторов в 2008 г. в данной области исследований в одной статье составляло 9 человек, среднее число опубликованных одним сотрудником в 2008 г. работ в данной области – 1.56 статьи, соответственно, число активно работающих в данной области научных сотрудников можно приблизительно оценить в пределах 1200 человек.

Анализ организаций, в которых научные сотрудники работают в данной

области, показал, что среди институтов РАМН наиболее активно исследования в данной области проводились в Медицинском радиологическом центре (75 публикаций), Институте вирусологии им. Д. И. Ивановского (49), Институте эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи (21).

Среди НИИ и ГНЦ исследования в этом направлении ведутся в Институте биофизики Министерства здравоохранения и социального развития (89 статей), ГНЦ вирусологии и бактериологии «Вектор» (21), ФГУ НИИ онкологии им. Н. Н. Петрова (21).

Из институтов РАН наибольшая публикационная активность в данной области отмечена у Института цитологии (47 публикаций), Института физиологии им. И. П. Павлова (45), Института химической физики им. Н. Н. Семенова (38), Института молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта (36), Института биохимической физики им. Н. М. Эмануэля (35).

Среди высших учебных заведений наиболее активно исследования в области ветеринарных технологий защиты животных проводились в Московском государственном университете им. М. В. Ломоносова (261 публикация), Военно-медицинской академии (г. Санкт-Петербург, 44), Московской медицинской академии им. И. М. Сеченова (29).

### ГЕНОМНЫЕ И ПОСТГЕНОМНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ СОЗДАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Геномные и постгеномные технологии создания лекарственных средств – новое направление фармакологии, обещающее быть весьма перспективным в будущем. Число российских публикаций по данной тематике, включенных в БД SCOPUS, за последние годы выросло в два раза – с 300 до 600 работ в год в области геномных исследований в целом и со 100 до 200 в области их приложения в фармакологии (рис. 14). Ключевыми словами для поиска были «genomics», «transcriptomics», «proteomics», «drug», «target», «drugs delivery», «antibiotic».

Работы российских ученых в данной области в основном публикуются в российских же журналах, таких как «Молекулярная биология», «Биохимия», «Генетика», «Микробиология», «Бюллетень эксперименталь-

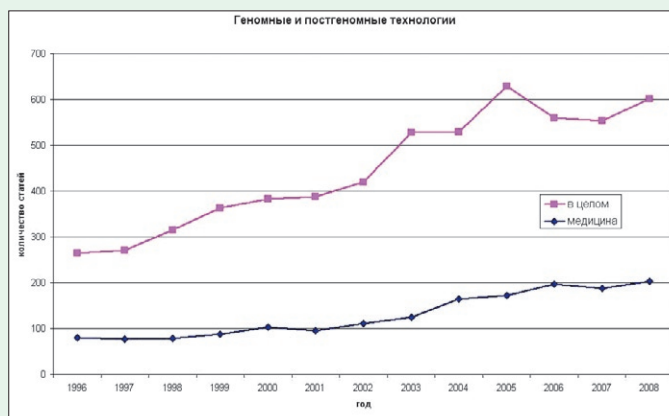


Рис. 14. Количество статей российских исследователей в области геномных и постгеномных технологий создания лекарственных средств

ной биологии и медицины», «Вопросы медицинской химии», «Антибиотики и химиотерапия». Некоторая часть работ российских исследователей, выполненных в этой области, публикуется в таких международных журналах, как «FEBS Letters», «Pharmaceutical Chemistry Journal», «Journal of Biological Chemistry», «Biophysics».

По данным анализа БД SCOPUS, среднее число соавторов в 2008 г. в данной области исследований в одной статье составляло 7.15 человек, среднее число опубликованных одним сотрудником в 2008 г. работ в данной области – 3.24 статьи. В целом геномными и постгеномными технологиями занимаются порядка 1200 человек, из них в области создания лекарственных средств – около 400 человек.

Анализ организаций, в которых научные сотрудники работают в данной области, показал, что среди институтов РАН наибольшая публикационная активность в данной области отмечена у Института цитологии (67 статей), Института молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта (66), Института

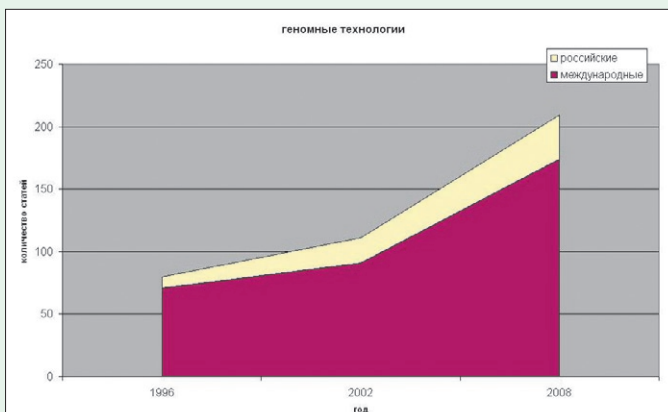
цитологии и генетики СО РАН (54), Института молекулярной генетики (50), Института биологии гена (43), Института биоорганической химии им. академиком М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова (26), Института органической химии им. Н. Д. Зелинского (20).

Из институтов РАМН исследования в данной области проводились в Российском онкологическом научном центре им. Н. Н. Блохина (46), Институте вирусологии им. Д. И. Ивановского (35), Институте экспериментальной медицины (30), Институте биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича (21).

Среди НИИ и ГНЦ больше всего исследований в этом направлении ведется во ФГУП ГНЦ ГосНИИГенетика (53 статьи), ГНЦ вирусологии и бактериологии «Вектор» (22).

Среди высших учебных заведений наиболее активно исследования в области геномных и постгеномных технологий проводились в Московском государственном университете им. М. В. Ломоносова (194 статьи), Санкт-Петербургском государственном университете (29), Московской

Рис. 15. Соотношение между количествами статей российских авторов в области геномных и постгеномных технологий создания лекарственных средств, опубликованных в российских и международных журналах



медицинской академии им. И. М. Сеченова (13).

Геномные и постгеномные технологии создания лекарственных средств наиболее активно развиваются в РАН, РАМН и институтах Минздрава, причем за 2002–2008 гг. произошел рост числа публикаций в данной области практически в два раза. Абсолютное большинство работ, включенных в БД SCOPUS по данным технологиям, опубликовано в международных журналах (рис. 15).

Однако, несмотря на существующую критическую технологию, связанную с биомедициной, представляется необходимым более внимательно рассмотреть именно сугубо медицинскую составляющую живых систем как фактор, наибольшим образом влияющий на качество жизни населения.

При этом сосредоточим внимание на таких активно развивающихся во всем мире областях, как адресная доставка лекарств, разработка новых лекарств для лечения социально значимых заболеваний, создание новых антибиотиков и противоопухолевых препаратов – иначе говоря, главных составляющих научных исследований для фармакологии.

### СИСТЕМЫ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ

Одно из главных направлений развития медицинских биотехнологий в мире – создание систем адресной доставки лекарственных соединений к патологически измененным клеткам и тканям организма. Разработка таких систем позволит значительно повысить эффективность лекарственной терапии заболеваний.

Наиболее активно работающие в этой области российские научные организации в составе РАН: Институт биорганической химии им. академиком М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова (34 публикации), Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (26), Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта (24), Институт биологии гена (15); в составе РАМН: Онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина (12), Институт биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича (12).

В составе ВУЗов: МГУ им. М. В. Ломоносова (31), Московская государственная академия тонких химических техно-

Рис. 16. Количество статей российских исследователей в области создания систем адресной доставки лекарств

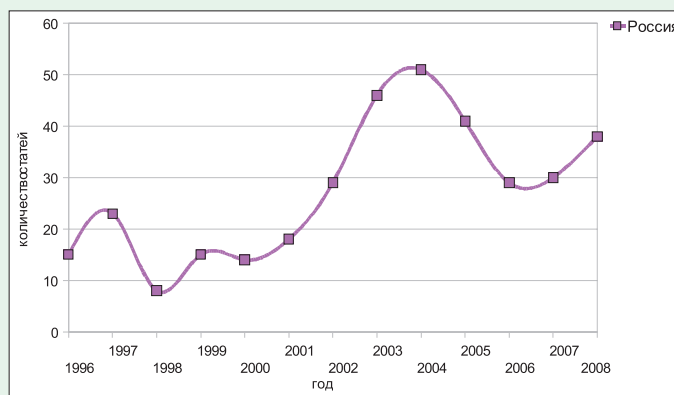
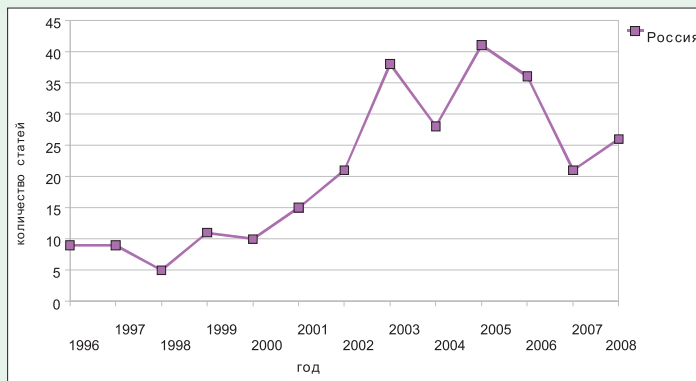


Рис. 18. Количество статей российских исследователей в области создания новых антибиотиков и средств лечения социально значимых заболеваний

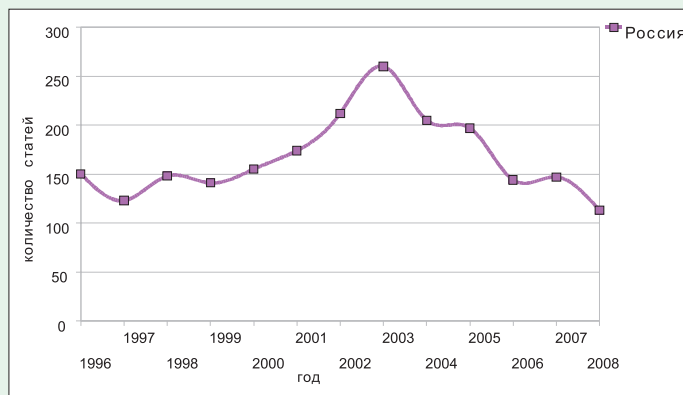


Рис. 17. Количество статей российских исследователей в области создания новых противоопухолевых средств и методов диагностики онкологических заболеваний

логий им. М. В. Ломоносова (13). В то же время, научно-исследовательские институты и государственные научные центры имели лишь единичные публикации.

### СОЗДАНИЕ НОВЫХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ СРЕДСТВ И МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Из числа институтов РАН ведущая роль в работах по данной тематике принадлежит Институту химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (16 статей), Институту молекулярной биологии

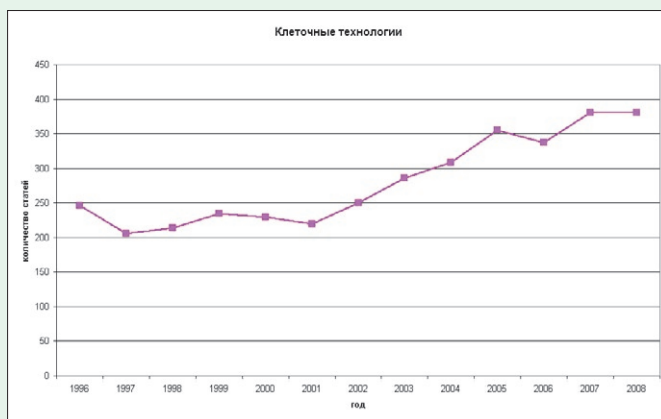
им. В. А. Энгельгардта (13), Институту прикладной физики (г. Нижний Новгород, 11), Институту биорганической химии им. академиком М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова (10).

В составе РАМН работы выполняются главным образом в Российском онкологическом научном центре им. Н. Н. Блохина (64 статьи).

### РАЗРАБОТКА НОВЫХ АНТИБИОТИКОВ И СРЕДСТВ ЛЕЧЕНИЯ СОЦИАЛЬНО ЗНАЧИМЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

В данной области, имеющей безусловно важное значение для нашей страны ввиду широкой распространенности

Рис. 19. Количество статей российских исследователей в области биосенсорных технологий



социально значимых заболеваний (туберкулез, СПИД, вирусные гепатиты В и С), наибольшую публикационную активность проявляют следующие организации: в составе РАН – Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского (37), Институт элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова (30), Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова (27), Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта (25), в составе РАМН – Институт фармакологии им. В. В. Закусова (25), Институт новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе (23), Институт биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича РАМН (22), в составе ВУЗов: МГУ им. М. В. Ломоносова (94), Московская медицинская академия им. И. М. Сеченова (60), Московская государственная академия тонких химических технологий им. М. В. Ломоносова (31).

### КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

Клеточные технологии – достаточно новое направление, успешно развивающееся в мире. Число публикаций

по данной тематике, включенных в БД SCOPUS, за последние годы выросло с 200 до почти 400 работ в год (рис. 19). Ключевыми словами для поиска были «cell», «technology».

Работы российских ученых в данной области в основном публикуются в российских же журналах, таких как «Бюллетень экспериментальной биологии и медицины», «Генетика», «Молекулярная биология», «Цитология». Некоторая часть работ российских исследователей, выполненных в этой области, публикуется в таких международных журналах, как «Pharmaceutical Chemistry Journal», «Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America», «FEBS Letters», «Journal of Biological Chemistry», «Journal of Molecular Biology».

По данным анализа БД SCOPUS, среднее число соавторов в 2008 г. в данной области исследований в одной статье составляло 5.8 человек, среднее число опубликованных одним сотрудником в 2008 г. работ в данной области – 3.19 статьи. В целом клеточ-

ными технологиями в РФ активно занимаются около 700 человек.

Анализ организаций, в которых научные сотрудники наиболее активно работают в данной области, показал, что среди институтов РАН наибольшая публикационная активность в данной области отмечена у Института молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта (99 статей), Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина (57), Института физиологии растений им. К. А. Тимирязева (51), Института биологии гена (50), Института молекулярной генетики (47), Института цитологии (43), Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова (41).

Из институтов РАМН наиболее активно исследования в данной области проводились в Институте биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича (56 публикаций), Российском онкологическом научном центре им. Н. Н. Блохина (46), Институте экспериментальной медицины (29).

Среди высших учебных заведений наиболее активно исследования в области клеточных технологий проводились в Московском государственном университете им. М. В. Ломоносова (526 статей).

Несмотря на то, что клеточные технологии развиваются уже достаточно долгий промежуток времени, они и сейчас являются активно развивающейся областью технологий живых систем. Если на протяжении 1996-2002 гг. публикационная активность ученых в данной области была достаточно стабильной и находилась на уровне 200-250 статей в год (около половины статей при этом публиковалась в международных журналах), то с 2002 гг. произошел значительный рост числа публикаций в этой области, причем именно за счет роста числа публикаций в международных журналах (рис. 20). Наиболее эффективно эти технологии развиваются в институтах РАН и высших учебных заведениях.

### ТЕХНОЛОГИИ БИОИНЖЕНЕРИИ

Технологии биоинженерии – также достаточно старое и развитое направление, которое продолжает достаточно успешно развиваться. Число российских публикаций по данной

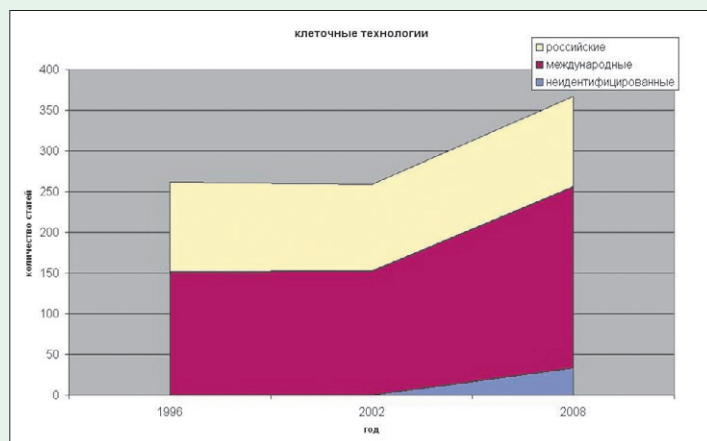


Рис. 20. Соотношение между количествами статей российских авторов в области клеточных технологий, опубликованных в российских и международных журналах

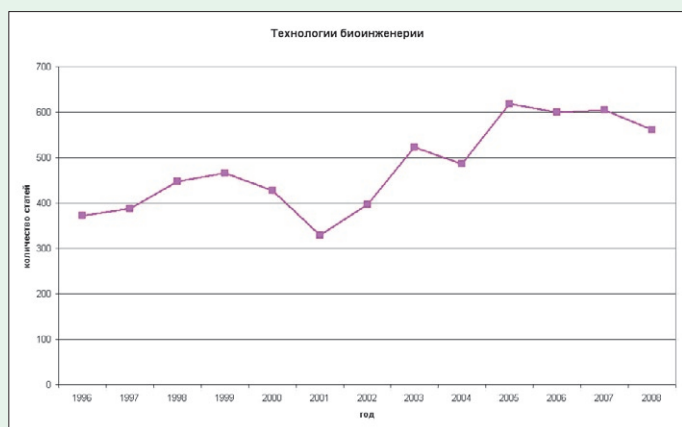


Рис. 21. Количество статей российских исследователей в области технологий биоинженерии

тематике, включенных в БД SCOPUS, за последнее время выросло наполовину – с менее чем 400 до почти 600 работ в год (рис. 21). Ключевыми словами для поиска были «bioengineering», «tissue».

Работы российских ученых в данной области в основном публикуются в российских же журналах, таких как «Биохимия», «Биофизика», «Бюллетень экспериментальной биологии и медицины», «Прикладная биохимия и микробиология», «Физиология растений». Однако значительная часть работ российских исследователей, выполненных в этой области, публикуется в таких международных журналах, как «Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America», «FEBS Letters», «Journal of Molecular Structure», «Nucleic Acids Research», «Journal of Biological Chemistry», «Protein Engineering».

По данным анализа БД SCOPUS, среднее число соавторов в 2008 г. в данной области исследований в одной статье составляло 6.4 человек, среднее число опубликованных одним сотрудником в 2008 г. работ в данной области – 2.05 статьи. В целом технологиями биоинженерии в РФ активно занимаются порядка 1900 человек.

Анализ организаций, в которых научные сотрудники наиболее активно работают в данной области, показал, что среди институтов РАН наибольшая публикационная активность в данной области отмечена у Института молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта (256 публикаций), Института молекулярной генетики (138), Института биорганотической химии им. академиков

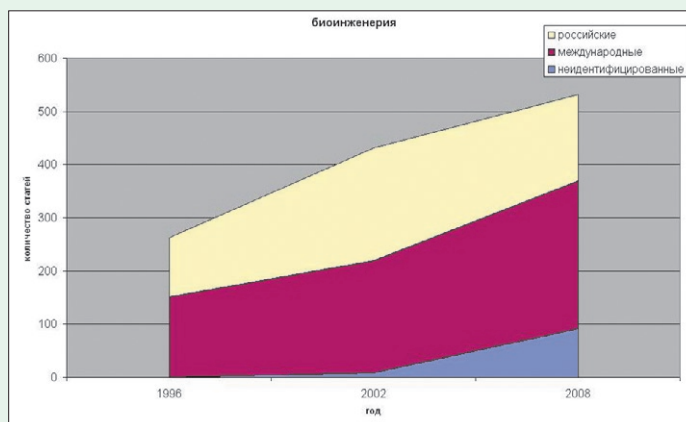
М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова (73) и многих других институтов.

Из институтов РАН наибольшее число исследований в данной области проводилось в Институте биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича (74 статьи), Всероссийском кардиологическом научном центре (62), Институте экспериментальной медицины (35), Российском онкологическом научном центре им. Н. Н. Блохина (31).

Среди НИИ и ГНЦ наиболее активно исследования в этом направлении ведутся во ФГУП ГНЦ ГосНИИГенетика (132 статьи), Институте иммунологии Федерального медико-биологического агентства (43), Объединенном институте ядерных исследований (41).

Среди высших учебных заведений исследования в области технологий биосинтеза проводились в Московском государственном университете им. М. В. Ломоносова (1005 статей), Санкт-Петербургском государственном университете (122), Московском инженерно-физическом институте (102).

Рис. 22. Соотношение между количествами статей российских авторов в области технологий биоинженерии, опубликованных в российских и международных журналах



Технологии биоинженерии за анализируемый промежуток времени развивались достаточно успешно, причем если в 1996–2002 гг. прирост числа публикаций шел в основном за счет публикаций в российских журналах, то в 2002–2008 гг. уже за счет увеличения числа публикаций в международных журналах, которое в 2008 г. уже превышало количество публикаций в российских журналах (рис. 22).

### ТЕХНОЛОГИИ СОЗДАНИЯ БИОСОВМЕСТИМЫХ МАТЕРИАЛОВ

Технологии создания биосовместимых материалов – также новое и активно развивающееся во всем мире направление. Число публикаций российских ученых по данной тематике, включенных в БД SCOPUS, за последние годы выросло наполовину – с одной в 1996 г. до 25 в 2006 г.. Однако в последние два года произошел спад публикационной активности российских ученых в этой области (рис. 23). Ключевыми словами для поиска были «implant», «tissue», «biocompatible».

Работы российских ученых в данной области в основном публикуются в таких международных журналах, как «Biomaterials», «Artificial Organs», «Biosensors and Bioelectronics», «Biomaterials, Artificial Cells and Artificial Organs».

Часть работ российских исследователей, выполненных в этой области, публикуется в российских журналах, таких как «Медицинская техника», «Бюллетень экспериментальной биологии и медицины», «Хирургия», «Архив патологии», «Вопросы медицинской химии».

По данным анализа БД SCOPUS, среднее число соавторов в 2008 г.

Рис. 23. Количество статей российских исследователей в области технологий создания биосовместимых материалов

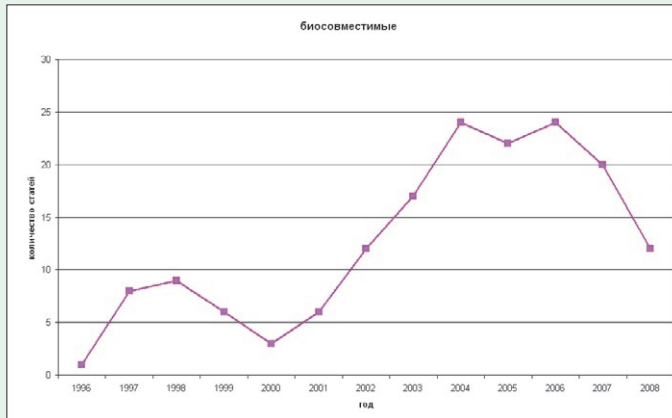


Рис. 24. Соотношение между количествами статей российских авторов в области создания биосовместимых материалов, опубликованных в российских и международных журналах

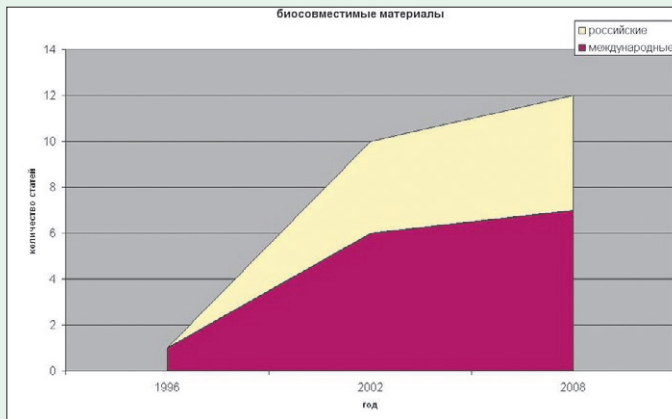
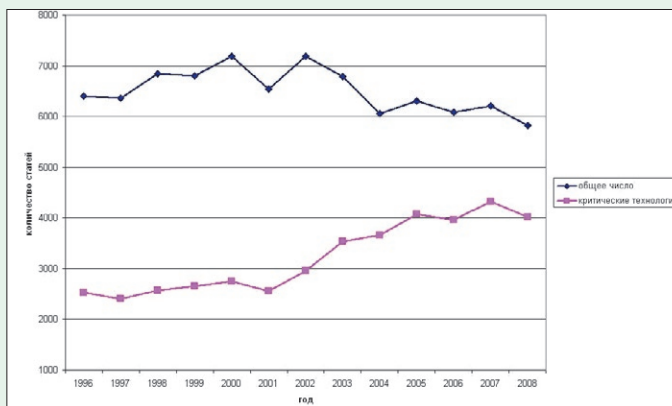


Рис. 25. Общее число публикаций российских авторов в науках о живом и число публикаций по критическим технологиям



в данной области исследований в одной статье составляло 4.83 человека, среднее число опубликованных одним сотрудником в 2008 г. работ в данной области – 1 статья. В целом технологиями создания биосовместимых материалов в РФ активно занимаются порядка 100 человек.

Однако следует отметить, что сотрудниками институтов РАН и РАМН, а также государственных научных центров и НИИ, публикуются лишь единичные статьи по теме создания биосовместимых материалов.

Среди высших учебных заведений наиболее активно исследования в области технологий биосинтеза проводились в Московском государственном университете им. М. В. Ломоносова (24 статьи).

Технологии создания биосовместимых материалов в российской науке по результатам анализа публикационной активности находятся в двойственном положении. С одной стороны, на протяжении всего проанализированного периода существует тренд роста числа публикаций по теме,

с другой стороны, само по себе число публикаций по теме незначительно, несмотря на значительное число организаций, занимающихся данной тематикой, причем на протяжении последних двух лет отмечается падение числа публикаций.

Приоритетное направление «Живые системы» и остальные биологические дисциплины – перераспределение ролей.

Прежде всего, необходимо отметить, что как принятие перечня критических технологий Российской Федерации, так и принятие Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России» оказало заметное влияние на развитие направлений наук о живом и технологий, отнесенных к живым системам. Число публикаций практически по всем критическим технологиям увеличилось, причем по некоторым (биоинформатика, биомедицина, биосенсоры, геномные технологии) – значительно, и в настоящее время составляет практически две трети от общего числа российских публикаций в области биологии и медицины. Несмотря на снижение общего числа работ в области биологии и медицины, с 2002 по 2008 г. число работ в области критических технологий выросло почти на треть и в 2008 г. составило в сумме около 4000 работ в год. Однако необходимо отметить, что публикационная активность в таких критических технологиях, как технологии биокатализа, ветеринарные технологии жизнеобеспечения, не изменилась, а публикационная активность в области технологий биосинтеза даже снизилась.

В то же время, обращает на себя внимание то, что рост количества публикаций по критическим технологиям был достигнут путем перераспределения общего числа публикаций в области биологии и медицины в сторону критических технологий. При этом синхронное падение общего числа публикаций по биологии в целом может быть следствием сокращения числа научных сотрудников к 2008 г. и, кроме всего прочего, свидетельствовать о наступлении в определенном смысле «насыщения» исследователями данной области (рис. 25). При этом



бросается в глаза рост публикационной активности исследователей в области критических технологий живых систем. В целом, число высокоэффективно работающих в области «живых систем» исследователей можно приблизительно оценить примерно в 10 тыс. человек.

### РОССИЙСКИЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЖУРНАЛЫ И ИХ ИМПАКТ-ФАКТОРЫ

Еще одним индикатором, позволяющим судить об уровне работ, публикуемых российскими авторами, служат импакт-факторы журналов. Под импакт-фактором (ИФ) подразумевают количество процитированных статей из журнала за два предыдущих года, отнесенное к общему количеству опубликованных статей в этом же журнале за эти годы. Несмотря на существующие проблемы корректного использования ИФ, на сегодняшний день общепризнано, что это один из формальных критериев, по которому можно сопоставлять уровень научных исследований в близких областях знаний. Соответственно, динамика изменения ИФ российских биологических журналов может свидетельствовать об изменении уровня работ, результаты которых опубликованы в этих журналах.

В БД SCOPUS депонированы 12 российских биологических журналов, динамика изменения их ИФ приведена в табл. 1.

Рост импакт-факторов наиболее заметен у журналов «Молекулярная биология», «Биохимия», «Биоорганическая химия» – т.е. тех журналов, в которых публикуются работы российских ученых из ведущих научных организаций страны. Суммарный импакт-фактор двенадцати журналов, представленных в табл. 1, возрос за три года с 4.303 до 6.076.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе проведенного исследования можно сделать следующие выводы.

С одной стороны, налицо явное отставание публикационной активности российских ученых в области биологии даже от развивающихся государств. Если называть вещи своими именами, то Россия, по сравнению с развитыми научными державами, движется в прямо противоположном направлении. Такой процесс, впро-

Табл. 1. Импакт-факторы российских биологических журналов

Название журнала	Год			
	2004	2005	2006	2007
Биохимия	1.058	0.858	1.368	1.476
Молекулярная биология	0.623	0.435	0.33	0.805
Биоорганическая химия	0.358	0.571	0.572	0.63
Микробиология	0.539	0.534	0.543	0.597
Прикладная биохимия и микробиология	0.381	0.310	0.444	0.51
Физиология растений	0.16	0.277	0.321	0.439
Биофизика	0.367	0.362	0.435	0.43
Журнал высшей нервной деятельности	0.229	0.368	0.379	0.369
Генетика	0.119	0.240	0.254	0.265
Бюллетень экспериментальной биологии и медицины	0.254	0.238	0.19	0.249
Журнал эволюционной биохимии и физиологии	0.178	0.238	0.206	0.199
Известия РАН. Серия биологическая	0.037	0.027	0.048	0.098

чем, может отражать общие тенденции в российской науке, прежде всего – старение кадрового состава исследователей и, как следствие, снижение доли исследователей высшей квалификации.

С другой стороны, имеет место увеличение доли публикаций, выполненных в рамках проектов, относящихся к критическим технологиям в области живых систем. Можно предположить, что к такому результату привело принятие Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России», существующей с 2002 г., а также ряд программ Российской академии наук («Фундаментальные науки – медицине», «Молекулярная и клеточная биология»). Вероятно, произошла переориентация части исследователей на выполнение работ в рамках этих программ. Повышение импакт-факторов ведущих российских биологических журналов указывает и на повышение качества работ, результаты которых представлены в этих журналах.

Анализ публикационной активности научных организаций показы-

вает, что в России сохранился пул научно-исследовательских институтов и ВУЗов, активно работающих в области живых систем. Это позволяет говорить о том, что определенный задел в области живых систем в России остался. При этом очень важной задачей государства должно стать не только поддержание, но и развитие этого задела.

Следующим – и более подробным – шагом в исследовании должен стать анализ публикаций, приходящихся на отдельные лаборатории. Это представляется логичным, поскольку более адекватный анализ эффективности научных коллективов можно проводить только на уровне лабораторий. Кроме того, будут исследованы совместные публикации отечественных ученых, работающих в российских научных организациях, с их зарубежными коллегами (совместные публикации дают представление об уровне научных работ). Наконец, предстоит детально проанализировать параметры публикационной активности отдельных ученых – лидеров в своих направлениях (прежде всего, речь идет об индексе цитирования). ●

# Современные технологии создания неприродных антител для клинического применения

С. М. Деев, Е. Н. Лебедеко

Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова  
Российской академии наук, Москва  
e-mail: dejev@ibch.ru

**РЕФЕРАТ** Модулярная структура и многофункциональность антител позволяет модифицировать природные иммуноглобулины различными способами для всевозможных клинических применений. Рациональный компьютерный дизайн и методы молекулярной инженерии дают возможность направленно модифицировать размер, аффинность, специфичность, иммуногенность и эффекторные функции антител, а также комбинировать их с другими действующими агентами. В обзоре рассмотрены современные методы инженерии иммуноглобулинов, ориентированных на применение в диагностике и терапии различных заболеваний, в т.ч. новые технологии, направленные на оптимизацию эффекторных функций терапевтических антител.

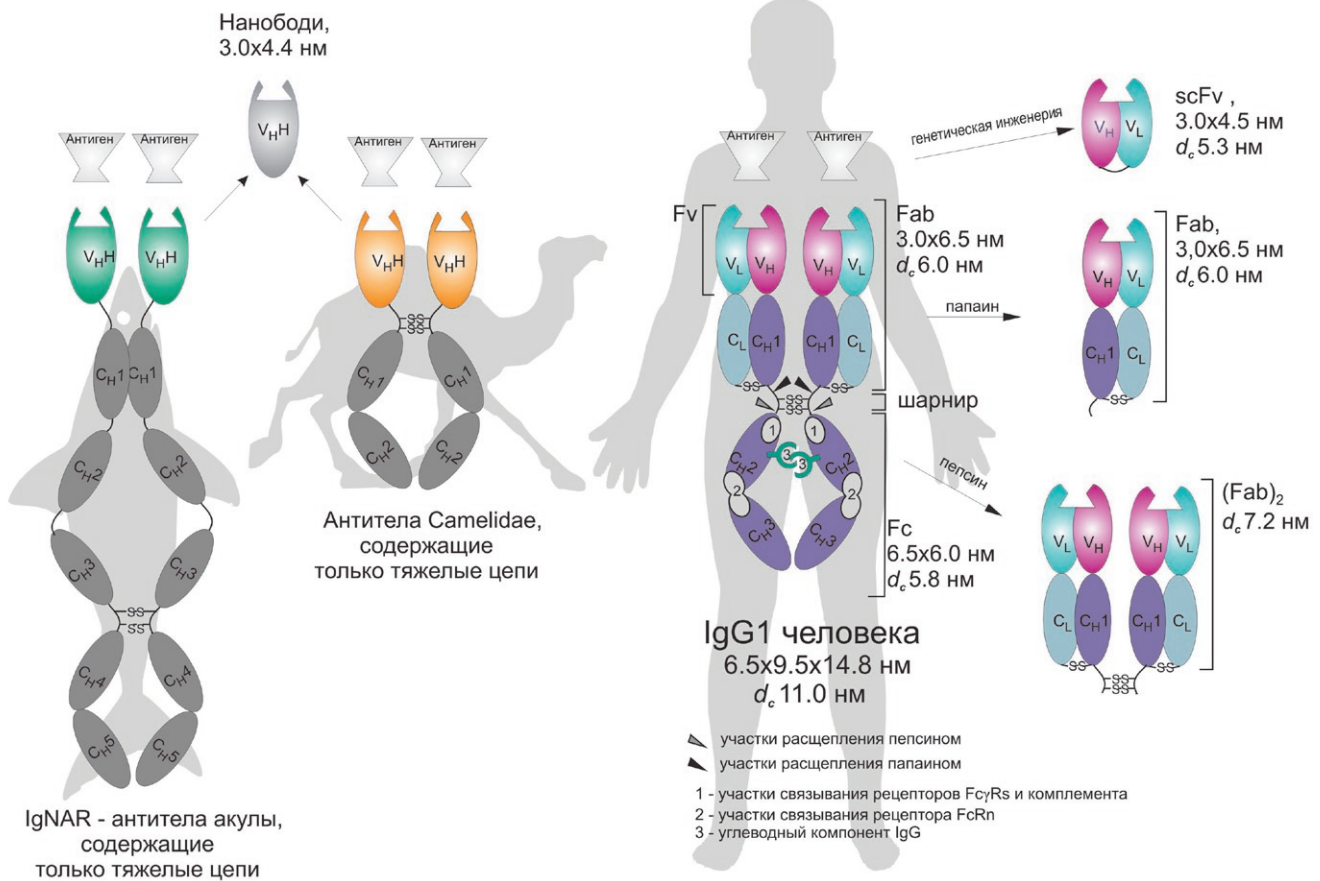
Ключевые слова: моноклональные антитела, гуманизированные антитела, одноцепочечные антитела, мультивалентность, биспецифичность, направленная доставка, модуль барназа:барстар, иммунодибарназа.

Сокращения: АЗКЦ – антителозависимая клеточная цитотоксичность; КЗЦ – комплементзависимая цитотоксичность; мкАТ – моноклональные антитела; СН и СL – константные домены тяжелой и легкой цепей антитела; клетки СНО – клетки яичника китайского хомячка; EGFR (HER1) – рецептор эндотелиального фактора роста, раковый маркер; Fab – антигенсвязывающий фрагмент антитела; Fc – константный (кристаллизующийся) фрагмент антитела; FcγR – клеточные рецепторы Fc-фрагментов антител; FcRn – неонатальный рецептор Fc-фрагментов антител; HER1 и HER2/neu – раковые маркеры группы тирозинкиназных рецепторов; IgA, IgG, IgD, IgE, IgM – иммуноглобулины A, G, D, E, M (антитела классов A, G, D, E, M); scFv – одноцепочечный вариабельный фрагмент антитела, PSMA – простатоспецифичный мембранный антиген; VEGF – эндотелиальный фактор роста сосудов; VH и VL – вариабельные домены тяжелой и легкой цепей антитела.

## ВВЕДЕНИЕ

Столетие назад антитела представлялись той «магической пулей», которая сможет избирательно поражать очаги заболевания в организме человека (см. Нобелевскую лекцию Пауля Эрлиха в 1908 г. [1]). Однако только в 1975 г. благодаря работе Кёлера и Мильштейна, положившей начало гибридной технологии получения моноклональных антител, эта идея Пауля Эрлиха начала обретать практические очертания. Гибридная технология позволяет получать в ответ на иммунизацию антигеном не набор разнообразных иммуноглобулиновых молекул (природные антитела), а антитело одного вида, направленное против одного специфичного антигена (моноклональное антите-

ло, мкАТ). Эта методология до сих пор остается краеугольным камнем инженерии антител. К сожалению, первые попытки применить мышинные мкАТ для клинических целей оказались далеки от успеха и выявили, как казалось, труднопреодолимые недостатки мкАТ: в ряде случаев низкую аффинность по сравнению с поликлональной антисывороткой; высокую иммуногенность по отношению к человеку и, как следствие, быстрое выведение из организма; неспособность задействовать систему комплемента и клеточные механизмы иммунного ответа в чужеродной системе. Несмотря на это, после трех десятилетий борьбы и поражений, надежд и рекламной шумихи мкАТ окончательно утвердились как лекарственные препара-



**Рис. 1.** Природные антитела и их фрагменты [9]. Fab и (Fab)<sub>2</sub> – антигенсвязывающие фрагменты IgG, получаемые с помощью гидролиза папаином и пепсином соответственно; Fc – С-концевая часть IgG, состоящая из константных доменов CH2 и CH3 тяжелых цепей, отвечает за эффекторные функции; Fv – переменный фрагмент, состоящий из переменных доменов легкой (VL) и тяжелой (VH) цепей; scFv – одноцепочечный переменный фрагмент, состоящий из VL и VH (объединенных генно-инженерным способом); VHH – нанокристалл, переменный домен антител хрящевых рыб и рода Camelidae, содержащих только тяжелые цепи; -S-S- – дисульфидная связь. Указаны линейные размеры антител и их фрагментов, измеренные методом атомно-силовой микроскопии [2, 3], а также гидродинамический диаметр d<sub>c</sub>, вычисленный по уравнению Стокса-Эйнштейна [4, 5]

ты, успешные как в клиническом, так и в коммерческом плане (табл. 1). Реализовать уникальный потенциал иммуноглобулинов, имеющих модулярную структуру и набор функций, связанных с отдельными структурными модулями, и модифицировать их для самых различных клинических применений удалось благодаря технологиям генетической инженерии и трансгенных животных. В зависимости от практической задачи исследователи могут изменять размер антител, их специфичность, аффинность, валентность, уменьшать иммуногенность, оптимизировать фармакокинетические свойства и эффекторные функции. В дополнение к этому, антитела получают в виде рекомбинантных составных белков, включающих антитела другой специфичности, цитокины, белковые токсины и радиоизотопы, ферменты, флуоресцентные белки. В настоящее время приняты для клинического применения около 30 препаратов антител, из них 89 % предназначено для онкологического и иммунологического применения, антитела используют также в трансплантологии, для лечения сердечно-сосудистых, аутоиммунных и инфекционных заболеваний (табл. 2). На фармацевтическом рынке антитела занимают второе

место по объему производства после вакцин. К 2011 г. прогнозируется увеличение продаж терапевтических препаратов антител до 21 млрд долларов США (табл. 1). Более 85 % разрешенных для клинического применения антител являются продуктами инженерии антител, к ним

**Табл. 1.** Коммерческий успех некоторых мкАТ, применяемых в онкологии [Deonarin, 2008]

Название антитела: коммерческое / по номенклатуре USAN <sup>1</sup>	Продажа в 2005-2006 гг., млн \$ США	Увеличение продаж в процентах по отношению к предыдущему году	Оценка рынка продаж в 2011 г., млн \$ США
Rituxan® / rituximab	3800	16	6300
Herceptin® / trastuzumab	3100	82	4800
Avastin® / bevacizumab	2400	77	7800
Erbixun® / cetuximab	1100	57	2100

<sup>1</sup> В настоящее время во всем мире используют номенклатуру моноклональных антител и их фрагментов, принятую в США (USAN – US Adopted Names; www.ama-assn.org), см. табл. 3.

Табл. 2. Препараты моноклональных антител, разрешенных к клиническому применению, и возможные осложнения при их применении.

Область применения	Коммерческое название	Наименование по USAN <sup>1</sup>	Формат антитела	Мишень
Терапия опухолевых заболеваний	Avastin®	Bevacizumab	IgG1 гуманиз.	VEGF
	Bexxar®	<sup>131</sup> I-Tositumomab	<sup>131</sup> I-IgG2a мыши	CD20 (В-клетки)
	Campath®	Alemtuzumab	IgG1 гуманиз.	CD52
	Erbix®	Cetuximab	IgG1 химерное	EGFR
	Herceptin®	Trastuzumab	IgG1	HER2
	Mylotarg®	Gentuzumab ozogamicin	Конъюгат гуманиз. IgG4-калихеамицин	CD33
	Prostascint®	Capromab pentetate	<sup>111</sup> In-IgG1 мыши	PSMA, prostate specific membrane antigen
	Rituxan®	Rituximab	IgG1 химерн.	CD20 (В-клетки)
	Vectibix®	Panitumumab	IgG2 человека	EGFR (HER1)
	Zevalin®	Ibritumomab tiuxetan	<sup>90</sup> Y-IgG1 мыши	CD20 (В-клетки)
Трансплантология	Orthoclone OKT3®	Muromonab-CD3	IgG2a мыши	CD3 (Т-лимфоциты)
	Simulect®	Basiliximab	IgG1 химерн.	CD25
	Zenapax®	Daclizumab	IgG1 гуманиз.	CD25
Сердечно-сосудистые заболевания	ReoPro®	Abciximab	F(ab)-химерный фрагмент IgG1	Комплекс гликопротеинов IIb-IIIa
	Монафрам®		Фрагмент F(ab') <sub>2</sub> IgG1 мыши.	Комплекс гликопротеинов IIb-IIIa на тромбоцитах
Терапия аутоиммунных заболеваний	Humira®	Adalimumab	IgG1 человека	TNFα
	Raptiva®	Efalizumab	IgG1 гуманиз.	CD11a
	Remicade®	Infliximab	IgG1 химерн.	TNFα
	Tysabri®, Antegren®	Natalizumab	IgG4 гуманиз.	Субъединица α4 интегринов α4β1 и α4β7
	Xolair®	Omalizumab	IgG1 гуманиз.	IgE
Другие	Lucentis®	Ranibizumab	F(ab)-гуманиз.фрагмент IgG1	VEGF
	Synagis®	Palivizumab	IgG1 гуманиз.	F-белок респираторного синцитиального вируса

<sup>1</sup> В настоящее время во всем мире используют номенклатуру моноклональных антител и их фрагментов, принятую в США (USAN – US Adopted Names; www.ama-assn.org), см. табл. 3.

относятся химерные, гуманизированные и полностью человеческие мкАТ, антитела, полученные с помощью фогового дисплея, генно-инженерные конъюгаты антител с цитокинами и токсинами. В стадии клинических испытаний находятся сотни производных антител, включающих антитела природного формата, полученные генно-инженерными способами: биспецифические антитела, одноцепочечные полноразмерные антитела, различные варианты укороченных антител, в т.ч. димеры и мономе-

ры Fab-фрагментов, scFv-фрагменты (одноцепочечные мини-антитела), однодоменные антитела (наноантитела) и др. В настоящем обзоре будут рассмотрены различные технологические приемы, позволяющие модифицировать молекулы иммуноглобулинов для конкретных клинических применений. Наибольшее внимание будет уделено инженерии антител для лечения и диагностики опухолевых заболеваний, поскольку именно в этой области особенно велика потребность в таких препаратах.

Применение, механизм действия (указано усиление ↑ или ослабление ↓ эффекта)	Фирма и год регистрации	Возможные осложнения при применении [http://www.i-sis.org.uk/WOFAMAD.php]
Рак кишечника. Связывание с лигандом, антагонист. Ангиогенез↓, метастазирование↓.	Genentech, 2004	Желудочно-кишечные перфорации и расхождение раны, в некоторых случаях с летальным исходом.
Неходжкинская лимфома. Радиоиммунотерапия, ADCC, CDC	GlaxoSmithkline, 2003	Реакции гиперчувствительности, включая анафилаксию.
В-клеточная хроническая лимфоцитарная лейкемия	Genzym/Schering, 2001	Снижение кроветворных функций костного мозга, в некоторых случаях – тяжелое, вплоть до летального исхода.
Метастатический рак кишечника, головы и шеи. Антагонист рецептора. Апоптоз↑, хемо- и радиочувствительность↑, пролиферация↓, ангиогенез↓, метастазирование↓.	Imclone/Bristol-Myers Squib, 2004	В 3 % случаев анафилактические реакции (бронхоспазм, хриплое дыхание, гипотензия), редко с летальным исходом (1 на 1000).
HER2-положительный метастатический рак груди. Пролиферация↓, ангиогенез↓, хемочувствительность↑	Genentech, 1997	Кардиомиопатия.
CD33-положительная острая миелоидная лейкемия. Инттоксикация клеток за счет индукции разрывов ДНК	Wyeth pharmaceuticals, 2000	Тяжелые реакции гиперчувствительности, включая анафилаксию, гепатотоксичность и гематологическую токсичность.
Диагностика рака простаты	Cytogen, 1996	Анафилактические или анафилактоидные реакции при однократном введении. При повторном введении – угроза жизни из-за серьезных системных реакций сердечно-сосудистой, дыхательной и нервной систем (шок, остановка сердца и дыхания, паралич).
Неходжкинская лимфома. хемочувствительность, ADCC, CDC	Genentech/Biogen, 1997	Реакции на внутривенное вливание. Анафилактический шок с летальным исходом.
Рак кишечника. Антагонист рецептора. Апоптоз↑, хемо- и радиочувствительность↑?, пролиферация↓, ангиогенез↓, метастазирование↓.	Amgen, 2006	Нет данных
Неходжкинская лимфома. Радиоиммунотерапия, апоптоз↑	Biogen IDEC, 2002	Схема лечения препаратом включает Rituxan® (см. выше).
Профилактика острого отторжения при пересадке почки. Блокирование активности T-киллеров.	Ortho Biotech, 1986	Аллергические и анафилактические реакции, в том числе: сердечно-сосудистый коллапс, остановка сердца и дыхания, судороги, отек мозга, слепота, паралич.
Профилактика острого отторжения при пересадке почки. Блокирование IL-2R.	Novartis, 1998	Тяжелые анафилактические реакции (через 24 ч), включая: гипотензию, бронхоспазм, остановку дыхания и сердца, аритмию, отек легких, лихорадку, потерю сознания.
Профилактика острого отторжения при пересадке почки. Блокирование IL-2R.	Roche, 1999	Тяжелые анафилактические реакции (через 24 ч), включая: гипотензию, бронхоспазм, остановку дыхания и сердца, аритмию, отек легких, лихорадку, потерю сознания.
Профилактика тромбоза. Антагонист гликопротеинов IIb-IIIa	Centocor/Elli Lilly, 1994	Нарушения пищеварения, изжога, отрыжка, зуд, онемелость; нарушения нервной системы, деменция.
Профилактика тромбоза артерий при коронарорепластике. Антагонист гликопротеинов IIb-IIIa	Фрамон ООО, Россия, 2002	Кровотечения, аллергические реакции, тромбоцитопения (единичные случаи глубокой тромбоцитопении), иммунный ответ в 5-6 % случаев
Ревматоидный артрит, псориаз. Блокирование активности TNFα, воспаление↓	Abbott Laboratories, 2002	Туберкулез, грибковая инвазия и другие инфекции, острая миелоидная лейкемия.
Псориаз. Блокирование активации Т-лимфоцитов	Genentech/Xoma, 2003	Гемолитическая анемия, серьезные инфекции, включая туберкулезную пневмонию, бактериальный сепсис, при антимикробной терапии
Болезнь Крона, ревматоидный артрит, воспалительные заболевания. Блокирование активности TNFα, воспаление↓	Centocor, 1998	Туберкулезная инфекция, иногда со смертельным исходом.
Множественный склероз. Угнетение миграции иммунных клеток в очаг воспаления.	Biogen Idec/Elan, 2004	Продажа приостановлена в 2005 г. Прогрессирующая лейкоэнцефалопатия в 1 случае продолжительного приема препарата.
Аллергическая астма. Препятствует выходу IgE из тучных клеток.	Genentech, 2002	Возникновение или рецидив рака.
Возрастная дегенерация сетчатки глаза. Блокировка ангиогенеза.	Genentech/Novartis, 2006	Аллергические реакции, интраокулярное воспаление, ретинальные кровоизлияния.
Профилактика инфекции респираторным синцитиальным вирусом.	Medimmune, 1998	В редких случаях острая гиперчувствительность, при повторном введении (1 на 100 тыс.) анафилаксия.

### 1. КАК УСТРОЕНО ПРИРОДНОЕ АНТИТЕЛО И ПОЧЕМУ ЕГО ПОТРЕБОВАЛОСЬ ВИДОИЗМЕНИТЬ ДЛЯ КЛИНИЧЕСКИХ ПРИМЕНЕНИЙ

Антитела, или иммуноглобулины (IgG), – это высокоспецифичные молекулы, которые способны узнавать и удалять из организма чужеродные антигены. Большинство антител млекопитающих обладают сходным общим строением и представляют собой бивалентные мультидоменные белки с двумя антиген-связывающими участками

(иммуноглобулин G (IgG) человека, *рис. 1*). Этот сложный Y-образный молекулярный комплекс состоит из двух идентичных тяжелых (~50 кДа) и двух идентичных легких (~25 кДа) цепей. Четыре междоменные дисульфидные связи обеспечивают стабилизацию всего молекулярного комплекса. Глобулярные структурные домены иммуноглобулинов с характерной β-складчатой структурой стабилизированы внутримолекулными дисульфидными связями и подразделяются на переменные (V) и константные

(С) домены. N-концевые домены легких и тяжелых цепей (вариабельные домены VL и VH) значительно варьируют у разных антител, остальная часть обеих полипептидных цепей (константные домены CL и CH) различается у разных классов антител, а также имеет видовую специфичность у антител одного класса. Структурные домены иммуноглобулина не только обособлены в пространстве, но и выполняют разные функции в процессе иммунного ответа.

Каждое антитело обладает уникальной специфичностью и высоким сродством ( $K_D$   $10^{-8}$ - $10^{-11}$  M) к своему антигену, которое обеспечивается комплементарностью антиген-связывающего участка антитела определенному участку молекулы антигена (эпитопу). Каждый антиген-связывающий участок сформирован двумя вариабельными доменами VH и VL, принадлежащими соответственно тяжелой и легкой цепям иммуноглобулина. В каждом из вариабельных доменов VH и VL выделяют по три гипервариабельные области, которые отвечают за комплементарность взаимодействия (англ. CDR – complementarity determined regions). Способность антител связывать одновременно два антигена значительно увеличивает функциональную аффинность (авидность) иммуноглобулинов и увеличивает время удерживания на поверхностных клеточных рецепторах и других поливалентных антигенах. Всего у человека известно пять классов антител (IgM, IgG, IgE, IgD и IgA). Недавно у некоторых организмов (верблюд, лама, акула) обнаружены неканонические антитела, полностью лишенные легких цепей, с двумя антиген-связывающими

участками, каждый из которых образован только одним вариабельным доменом тяжелой цепи. Такие вариабельные домены верблюда получили название «наноантител» (англ. nanobody) (рис. 1).

Константная часть иммуноглобулина состоит из одного домена у легких цепей (CL) и трех или четырех доменов (в зависимости от класса) у тяжелых цепей (CH). Гидрофобные участки на границе CH1 и CH2-доменов сохраняют относительную подвижность, образуя шарнирную область, обеспечивающую смещение Fab-фрагментов и их вращение вокруг шарнира. Константные домены тяжелых цепей, как правило, гликозилированы, причем тип гликозилирования сильно варьирует у разных видов организмов и влияет на эффекторные функции иммуноглобулинов. Более того, даже антитела одного изотипа внутри одного вида организмов могут иметь гетерогенное гликозилирование.

Константная часть IgG содержит участки связывания с белком системы комплемента C1q и клеточными рецепторами Fc-фрагментов (FcγR), опосредствующими эффекторные (вторичные) функции иммуноглобулинов, т.е. их способность убивать клетки-мишени, запуская механизмы антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ; англ. ADCC – antibody dependent cellular cytotoxicity) и комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ; англ. CDC – complement-dependent cytotoxicity) (рис. 2). Способность иммуноглобулинов G и M связываться с неонатальным Fc-рецептором (FcRn) играет важную роль в контроле уровня антител в сыворотке крови. Таким образом, при иммунном ответе организм вырабатывает слож-

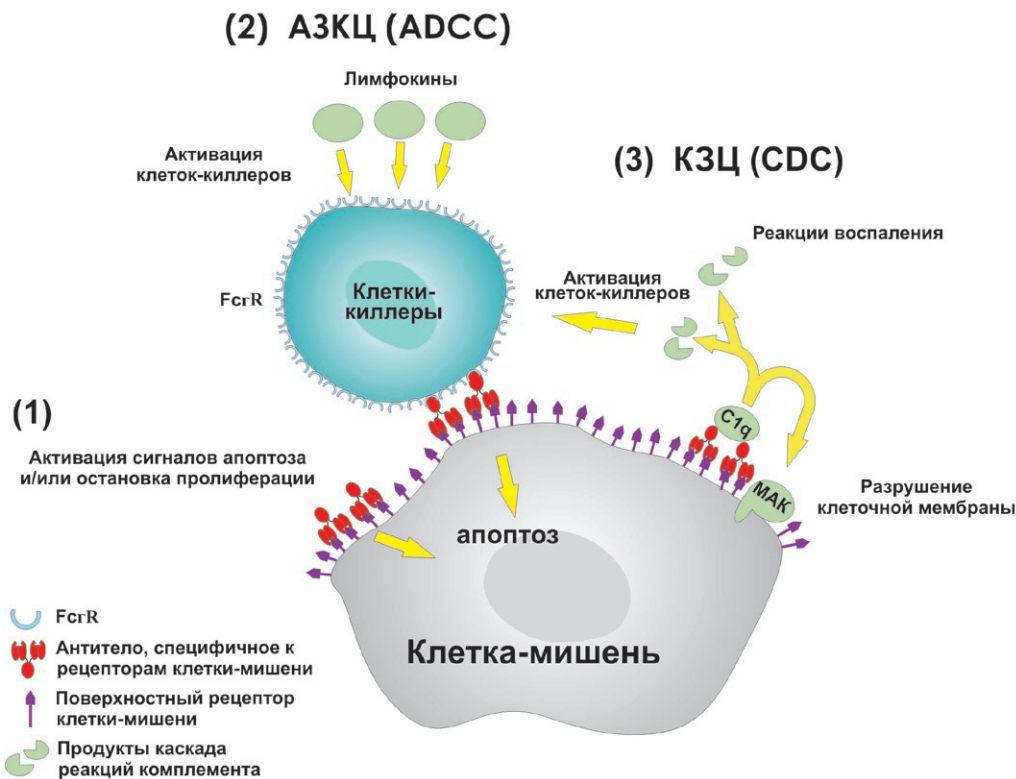


Рис. 2. Схема взаимодействия неагруженных антител с клеткой-мишенью. (1) Антитела способны вызывать апоптоз или остановку пролиферации клеток-мишеней, связываясь с мембранными антигенами на их поверхности (membrane raft mechanism) [6]. (2) Антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ). Киллерные клетки, несущие на поверхности рецепторы константных доменов IgG FcγRI (CD16), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD64) (природные киллеры, киллеры, активированные лимфокинами, макрофаги, фагоциты) и рецепторы константных доменов IgE FcεRI и FcεRII (CD23) (эозинофилы) атакуют клетку-мишень, с поверхностными антигенами которой связались антитела. (3) Комплементзависимая цитотоксичность (КЗЦ). Парно сближенные антитела, связываясь с белковым комплексом C1q, вызывают каскад реакций системы комплемента, что приводит к разрушению мембраны. Отдельные продукты этого каскада реакций привлекают иммунные клетки или способствуют возникновению анафилактического шока

ный набор разнородных молекул, которые могут включать сразу несколько клеточных механизмов удаления чужеродного антигена и целый каскад биохимических реакций, предназначенных для этой цели.

Начало современной инженерии антител положила гибридная технология, предложенная Кёлером и Мильштейном в 1975 г. [7]. Этот метод заключается в слиянии (гибридизации) иммунных лимфоцитов (спленоцитов), синтезирующих антитела нужной специфичности, с бессмертной миеломной линией. Полученная в результате клеточная линия (гибридома) секретирует моноклональные антитела (мкАТ), т.е. антитела одного вида, специфичные к антигену, использованному для иммунизации. Культивирование гибридомы в культуре *in vitro* или выращивание ее в виде асцита у мышей позволяет иметь постоянный источник антител определенной специфичности. Слияние гибридом разной специфичности позволяет получать так называемые квадromы, продуцирующие наряду с исходными мкАТ моноклональные биспецифичные антитела, способные связываться с двумя разными антигенами.

Внедрение гибридной технологии определило колоссальный прогресс в использовании антител как для исследовательских, так и для практических целей (диагностика *in vitro*). Однако надежды на создание специфичных и высокоэффективных противоопухолевых препаратов на основе мкАТ и их конъюгатов с действующими агентами и быструю замену сывороточных вакцин препаратами мкАТ против патогенных микроорганизмов и их токсинов не оправдались. Далеким от оптимального было и применение мкАТ для доставки радиоактивных изотопов к клеткам-мишеням. Оказалось, что мкАТ имеют ряд особенностей, которые делают их применение в клинике неэффективным и опасным. На первых этапах индивидуальные мкАТ, полученные из пула гибридом, часто обладали значительно сниженной эффективностью взаимодействия с антигеном по сравнению с титром поликлональной антисыворотки. Это было обусловлено взаимодействием индивидуальных мкАТ с единственным эпитопом антигена, а также, возможно, частичной инактивацией антител в процессе их выделения. Полноразмерные мкАТ обладают неоптимальными фармакокинетическими свойствами при их использовании в качестве нацеливающих молекул. Мышинные мкАТ как чужеродные белки быстро подвергаются катаболизму, кроме того, они слабо взаимодействуют с неонатальным рецептором FcRn, отвечающим за рециркуляцию иммуноглобулинов из лизосом, что также ускоряет их вывод из кровотока. Наоборот, собственные полноразмерные антитела циркулируют по кровотоку до 2 недель. Из-за высокой молекулярной массы (150 кДа) иммуноглобулины медленно распределяются в организме, плохо проникают в ткани и не выводятся через почки. Ксеногенная природа мкАТ не позволяет задействовать систему комплемента и клеточные механизмы элиминации чужеродного антигена (АЗКЦ, КЗЦ) из-за плохого распознавания мышинных мкАТ Fc-рецепторами клеток иммунной системы человека. Высокая иммуногенность мышинных мкАТ для человека обусловила чрезвычайно опасную их клинического применения из-за возникновения гипериммунных реакций. При использовании первого поколения иммунотоксинов были отмечены также

сильные побочные эффекты, связанные с природой присоединяемого токсина. Необходимо отметить, что даже достаточно успешно применяемые в клинике в настоящее время препараты мкАТ имеют опасные побочные эффекты (табл. 2).

В результате проб и ошибок был приобретен опыт и новое знание о механизмах взаимодействия антител с мишенями. Стало ясно, что для конкретных случаев клинического применения мкАТ необходимы их видоизменения, часто взаимно противоположные. Наибольший вклад в инженерию антител наряду с гибридной технологией внесли генная инженерия и технология трансгенных животных. Постараемся дать представление об основных направлениях инженерии антител для клинического применения. В настоящее время в мире принята американская система названий препаратов антител по USAN (US Adopted Names; www.ama-assn.org), которая представлена в табл. 3.

## 2. УКОРОЧЕННЫЕ ФРАГМЕНТЫ АНТИТЕЛ И АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ КАРКАСНЫЕ БЕЛКИ СО СПЕЦИФИЧЕСКИМ СВЯЗЫВАНИЕМ АНТИГЕНОВ

Первоначально наиболее привлекательным свойством антител в контексте конструирования «магической пули» было специфическое связывание с антигеном, которое должно обеспечивать доставку действующего агента (например, радиоактивного изотопа) к клетке-мишени. При этом решающими факторами, обеспечивающими эффективность этой доставки, являются аффинность и специфичность антитела по отношению к антигену и такие его физико-химические свойства, как валентность, поверхностный заряд и размер [8, 9].

Специфичность антитела, конструируемого для терапевтического применения, определяется выбором подходящей мишени. Разрешенные для клинического применения мкАТ направлены против 15 мишеней, большинство из которых является поверхностными клеточными антигенами, в т.ч. такими распространенными опухолевыми маркерами, как HER1, HER2/neu и PSMA (англ. prostate specific membrane antigen) (табл. 2). В течение последнего десятилетия достигнут огромный прогресс в понимании механизмов действия антител и в разработке новых мишеней для лечения онкологических, аутоиммунных, инфекционных, сердечно-сосудистых и др. заболеваний.

В недавних обзорах выделено пять групп потенциальных мишеней для антител, перспективных для терапии рака: раковые клетки внутри солидной опухоли – наименее поддающиеся терапии; диффузные злокачественные клетки (лейкемия); ассоциированная с опухолью строма (фибробласты); ассоциированные с опухолью кровеносные сосуды и факторы роста сосудов (сосудистый эндотелиальный фактор роста; англ. VEGF – vascular endothelial growth factor) [10, 11]. Дополнительные мишени могут возникать в ответ на блокирование поверхностных рецепторов [12] или специально индуцироваться на раковых клетках под воздействием лекарственного средства [13].

Аффинность антител, применяемых для терапии в настоящее время, лежит в пределах наномолярных концентраций (от  $10^{-8}$  до  $10^{-10}$  М), которые являются оптимальными для большинства задач. Было показано, что увеличение аф-

Табл. 3. Номенклатура терапевтических препаратов антител и их фрагментов по USAN (US Adopted Names; www.ama-assn.org)

Приставка	Вид заболевания или мишень	Источник происхождения антитела	Суффикс	Примеры	
Подходящий слог(и), отличающийся от уже использованных.	vir - вирусное bac - бактериальное lim - иммунная система les - инфекционное cir - сердечно-сосудистое fung - грибковое ner - нервная система kin - интелейкины mul - скелетно-мышечная система os - кости toxa - токсины anibi - ангиогенез Опухоли: col - толстой кишки mel - меланомы mar - молочной железы got - семенника gov - яичника pro - простаты tum - разные	u - human (человек) o - mouse (мышь) a - rat (крыса) e - hamster (хомяк) i - primate (примат) axo - крыса/мышь xi - chimera (химерное) zu - humanized (гуманизированное) xizu - комбинация химерных и гуманизированных цепей	mab		
	tras	tu	zu	mab	Trastuzumab (Herceptin®) – гуманизированное мкАТ против опухолей
	ab	ci	xi	mab	Abciximab (ReoPro®) – химерное мкАТ для профилактики тромбоза артерий
	r	anibi	zu	mab	Ranibizumab (Lucentis®) - гуманизированное мкАТ для блокирования ангиогенеза
<p>Для того чтобы создать <b>новое обозначение</b>, необходимо:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>· выбрать подходящий слог(и), отличающийся от уже использованных, и поставить его в начале слова;</li> <li>· затем добавить слоги в следующем порядке: класс заболевания (вид опухоли) или мишень, источник происхождения, суффикс mab;</li> <li>· для облегчения произношения последняя согласная в слоге, обозначающем мишень, может быть опущена.</li> </ul>					

финности антитела до  $10^{-11}$  М ухудшает его проникновение к опухоли и уменьшает селективность нацеливания [14].

Размер молекул терапевтического антитела является важным фактором, определяющим возможность их вывода через почки и, соответственно, быстроту выведения из организма. Время полувыведения белков через почки коррелирует с размером молекулы: порог клубочковой фильтрации оценивается в 60–65 кДа [15]. Тогда как полно-размерные молекулы IgG (~150 кДа) (рис. 1) слишком велики и не выводятся через почки, scFv-фрагменты (~30 кДа) (рис. 1), наоборот, имеют период полувыведения всего 0.5–2 ч и быстро покидают организм [16]. Промежуточное положение занимают мономерные Fab-фрагменты (48 кДа) с временем полувыведения 14–15.5 ч [16, 17].

Оптимальным поверхностным зарядом для терапевтических антител является интервал их изоэлектрических точек от 5 до 9. Увеличение как положительного, так и отрицательного заряда ухудшает связывание антитела с клетками-мишенями [18].

Валентность рекомбинантного антитела по отношению к антигену, на который оно нацелено, играет важную роль в удерживании мкАТ на клетках-мишенях. Большинство природных антител млекопитающих являются двухвалентными. Способность связывать одновременно два антигена значительно увеличивает функциональную аффинность, или avidность, иммуноглобулинов и обеспечивает длительное удерживание на клеточных поверхностных рецепторах и поливалентных антигенах. Это свойство используется в живой природе: тетра- и декавалентные комплексы антител классов А и М имеют повышенную

аффинность многоточечного связывания поливалентных антигенов и могут эффективнее выполнять свою защитную роль против таких природных поливалентных антигенов, как патогенные микроорганизмы.

Таким образом, применение антител в качестве нацеливающих компонентов для доставки диагностических и терапевтических агентов, в первую очередь радиоактивных изотопов, а также в качестве специфических блокаторов патогенных процессов требовало исключения эффекторных функций и кардинальной модификации их физико-химических свойств.

Первые укороченные фрагменты антител, мономерный Fab и димерный (Fab)<sub>2</sub> (рис. 1), предназначенные для использования в радиоиммунотерапии, были получены обработкой интактных IgG протеолитическими ферментами папаином или пепсином (рис. 1). Эти фрагменты лишены домена Fc, который опосредует эффекторные свойства IgG, нежелательные в данном случае, и не способны к рециркуляции из лизосом, что способствует снижению дозозимитирующей миелотоксичности и неспецифического радиоактивного фона по сравнению с полноразмерными IgG. При этом полученные фрагменты сохраняют антигенсвязывающие свойства, сравнимые с таковыми родительских антител. Примерами терапевтического использования мономерного Fab-фрагмента являются антиагреганты ReoPro® (Abciximab) и его российский аналог Монафрам® [19], которые применяются в кардиохирургической практике для профилактики тромбозов, а также блокатор ангиогенеза Lucentis® (Ranibizumab), применяемый для лечения возрастной дегенерации сетчатки глаза (табл. 2). Благодаря



уменьшенному формату препарат Lucentis® (Ranibizumab), в отличие от полноразмерных антител, хорошо проникает через внутреннюю оболочку глаза, обуславливая возможность именно этого клинического применения [17]. Основными недостатками ферментного метода получения фрагментов антител являются определенная сложность очистки целевого продукта и возможность дальнейшей модификации физико-химических свойств антитела только путем химической модификации. Кроме того, первое поколение Fab-фрагментов имело мышинное происхождение и потому имело высокую иммуногенность.

Развитие методов генетической инженерии позволило упростить получение укороченных производных антител. Рекомбинантные антитела, т.н. одноцепочечные варибельные фрагменты, scFv (англ. single chain variable fragments) (рис. 1), кодируются одним геном и содержат только один антиген-связывающий участок, состоящий из варибельных доменов легкой (VL) и тяжелой (VH) цепей, соединенных гибким пептидным линкером [20] (рис. 1). Эти scFv-фрагменты моновалентны и часто имеют сниженную аффинность по сравнению с исходной. Быстрое выведение из организма и гомогенная локализация на мишени делает их более пригодными для доставки радионуклидов, чем родительские полноразмерные IgG. Другим очень важным преимуществом одноцепочечных антител является их совместимость с бактериальными системами экспрессии, уменьшенная иммуногенность и отсутствие эффекторных функций. Несмотря на это, моновалентные scFv-фрагменты не получили широкого терапевтического применения, поскольку даже высокоаффинное, но моновалентное связывание с антигеном на поверхности клеток не обеспечивает длительного удерживания антитела и приводит к его быстрой диссоциации.

Клонирование одноцепочечных антител с сохраненными антиген-связывающими функциями имело чрезвычайно важные последствия. С этого момента началось бурное развитие технологий создания природных антител практически любой специфичности. Были сконструированы разнообразные коллекции (библиотеки) рекомбинантных фрагментов антител, разработаны современные методы, увеличивающие их разнообразие, технологии, позволяющие увеличивать аффинность антител и эффективно отбирать нужные варианты [21, 22]. Разработаны селекционные платформы для иммуноглобулиновых библиотек на основе фагового, дрожжевого и рибосомного дисплея [23]. Перспективным источником антигенсвязывающих фрагментов с необычными свойствами стали неканонические антитела хрящевых рыб и животных рода Camelidae (верблюды, лама) (рис. 1), содержащие только тяжелые цепи. Антигенсвязывающий участок таких антител сформирован единственным варибельным доменом, который обладает хорошей растворимостью, высокой стабильностью и способностью связываться с труднодоступными антигенами [24, 25].

Параллельно началось интенсивное развитие молекулярных конструкций, альтернативных связывающим доменам антител, которые обозначаются в англоязычной литературе термином «scaffold». Этот термин вводится А. Плюктуном [26] для обозначения белкового остова или каркаса (framework), который может нести видоизменяемые (altered) аминокислотные остатки или небольшие последо-

вательности, придающие различным вариантам белка разные функции, обычно возможность эффективного связывания со специфичными мишенями. На русский язык слово scaffold переводится как «эшафот» или «(строительные) леса». Второе значение этого слова подходит по смыслу, но его трудно использовать в контексте белковой инженерии. Поэтому мы предлагаем использовать термин «каркасный белок» или «каркасный пептид» наряду с английской калькой «скафолд».

Типичными природными каркасными белками, или «скафолдами», являются антитела и Т-клеточные рецепторы. Существует множество других, природных и неприродных, каркасных белков, например аффибоди, пептабоди, анкириновые повторы, липокалины и др. [26]. Разработка альтернативных каркасных соединений – это перспективное направление для создания новых форматов соединений, специфически связывающихся с молекулярными и клеточными мишенями, предназначенных для биомедицинского применения и особенно подходящих для роботизированных технологий и конструирования супрамолекулярных наноструктур. Подтверждением этому является создание Европейской ассоциации ProteomeBinders с целью планомерного изучения протеома человека с помощью высокоаффинных реагентов [27].

### 3. ГЕНО-ИНЖЕНЕРНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ОПТИМИЗАЦИИ БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЯ И ФАРМАКОКИНЕТИКИ

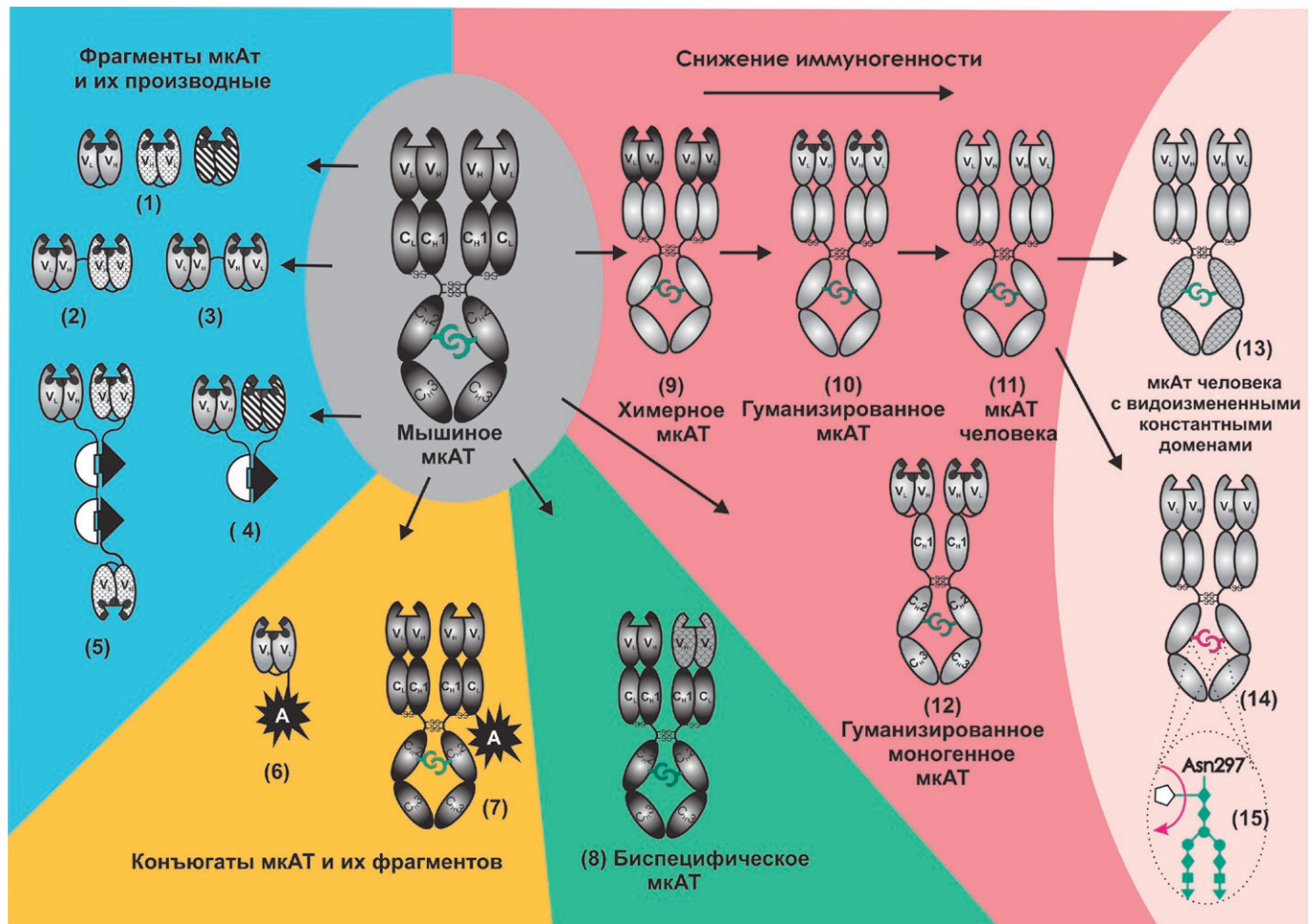
Большое число теоретических и экспериментальных данных говорят о том, что самым простым способом преодолеть несовершенство рекомбинантных одноцепочечных Fv-фрагментов антител является возвращение к исходно присущему свойству антител – мультивалентности. Действительно, немало усилий приложено для конструирования мультимерных форматов укороченных антител с целью оптимизировать их фармакокинетические свойства и улучшить биораспределение доставляемых антителами действующих агентов. В настоящее время большое число таких конструкций проходит клинические испытания [28, 29].

За последнее десятилетие был разработан целый ряд подходов к инженерии мультивалентных антител, подробно описанных в нашем обзоре [9]. Валентность сконструированных мультивалентных производных, т.е. число связывающих антиген единиц может варьировать от 2 до 10. Предложенные стратегии основаны на химической конъюгации фрагментов антител, использовании самоассоциирующихся пептидов и феномена перестановки доменов при смешивании двух антител разной специфичности. Бивалентные тандемные и биспецифические антитела получают линейным слиянием генов. Более универсальный характер имеет применение гетеродимеризационных модулей, в т.ч. стрептавидин-биотиновой системы, модуля барназа:барстар [30, 31], метода «застежки-кнопки» [32] и «замка на причале» [33, 34] и др. Каждая стратегия имеет свои преимущества и недостатки, но ни одна не является универсальной. Систематизация и сравнительный анализ экспериментальных данных по фармакокинетике мультивалентных производных антител разного формата, направленных к раковым маркерам HER2/neu, CEA и маркеру ангиогенеза ED-B-домену фибронектина, показали,

что в большинстве случаев наблюдается существенное улучшение фармакокинетических характеристик и биораспределения при переходе от моновалентного к бивалентному (мультивалентному) формату антитела [9].

Еще одним важным способом варьировать фармакокинетические характеристики мкАТ является тонкая сайт-специфическая модификация константного домена в зависимости от конкретного применения конструируемого иммуноглобулина. Неонатальный или, как его еще называют, спасательный (англ. salvage) рецептор Fc (FcRn) выполняет в организме важные функции: отвечает за перенос IgG через эпителиальный и эндотелиальный барьеры, в частности, за передачу иммуноглобулинов от матери ребенку, и обеспечивает защиту IgG и альбумина от катаболизма в лизосомах эндотелия сосудов [35]. FcRn обладает высоким сродством к IgG при pH 6.0 и не связывается с ним при pH 7.2. Таким образом, механизм защиты IgG

от катаболизма основан на связывании FcRn с антителами в лизосомах при pH 6.0 и возврате их в кровотоки [36]. Направленный мутагенез Fc-фрагмента позволяет получать варианты антител, произвольно изменяя время их полужизни в кровотоке [37]. Путем замены ключевых аминокислотных остатков в участках константного домена мышиных привораковых антител, вовлеченных во взаимодействие с FcRn, был получен ряд мутантов с временем полужизни от 8 до 80 ч в организме мыши, тогда как этот показатель для антител дикого типа составляет ~12 дней [38]. Такие антитела быстро выводятся из организма, что крайне важно при радиоиммунотерапии, и улучшают разрешение при сцинтиграфии. Наоборот, мутантные антитела с повышенной аффинностью связывания с FcRn при pH 6.0 обладают более длительным временем полужизни в организме [39]. Увеличение времени циркуляции важно при использовании терапевтических антител для лечения



**Рис. 3.** Основные направления модификации мышиных моноклональных антител (мкАТ) для клинического применения. Показаны фрагменты мкАТ, полученные генно-инженерными методами, в т.ч.: (1) – одноцепочечные антитела (scFv или мини-антитела) разной специфичности, состоящие из VL- и VH-доменов, связанных пептидным линкером; (2) – биспецифическое мини-антитело; (3) – димерное мини-антитело; (4) и (5) – димер и тример мини-антитела, связанные с помощью модуля барназа:барстар; (6) – конъюгат мини-антитела с биоактивным агентом, полученный генно-инженерным способом; (13) – мкАТ человека с видоизмененными константными доменами; (14) – мкАТ человека с видоизмененным углеводным компонентом (15). Условные обозначения антител и их фрагментов, как на рис. 1: черным цветом обозначены гипервариабельные районы вариабельных доменов (CDR), темно-серым – мышиные антитела и фрагменты, светло-серым – человеческие, штриховкой – вариабельные домены разной специфичности (1-5) и модифицированные константные домены (13). Белый полукруг и черный треугольник – барназа и барстар соответственно. А – биоактивный агент (радиоактивный изотоп, токсин, фермент, флуоресцентный белок и т.д.)

инфекционных заболеваний или нейтрализующих антител для лечения острых отравлений. Например, введение тройной мутации M252Y/S254T/T256E в константный домен мкАТ, специфичных к респираторному синцитиальному вирусу, увеличило в 10 раз их связывание при pH 6.0 с FcRn человека и макака-крабоеда (*Macaca fascicularis*). В то же время мутантные мкАТ легко отделялись от антител при pH 7.4. Исследование фармакокинетических свойств мутантных мкАТ на модели примата показало, что как время их полужизни в кровотоке, так и накопление в легких увеличились в 4 раза [40]. Интересно отметить, что мутагенез аминокислотных остатков константного домена, отвечающих за связывание с FcRn, в большинстве случаев не затрагивал других эффекторных свойств антитела. Таким образом, направленное изменение FcRn-связывающих участков является перспективным методом для управления фармакокинетическими свойствами мкАТ, конструируемых для различных применений. Кроме того, создание пептидных антагонистов, блокирующих рецептор FcRn, может быть использовано для снижения уровня патогенных IgG в организме, что является еще одним подходом для лечения аутоиммунных заболеваний [41].

Альтернативным способом улучшения фармакокинетики и биораспределения производных мини-антител является присоединение к ним полиэтиленгликоля [42] и альбумина [43], что увеличивает молекулярную массу соединения и, соответственно, замедляет экскрецию через почки. Не исключено, что в случае альбумина привлекается дополнительно механизм рециркуляции, опосредованный неонатальным рецептором [44].

#### 4. УМЕНЬШЕНИЕ ИММУНОГЕННОСТИ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ (ГУМАНИЗИРОВАНИЕ)

Одной из первых проблем, возникших при создании антител для клинического применения, являлась сильная иммуногенность мкАТ ксеногенного для человека происхождения. Иммунный ответ на введение мышинных мкАТ (НАМА-response – human anti-mouse antibodies response) приводит к серьезным системным реакциям организма человека вплоть до анафилактического шока (табл. 2). Применение методов генетической инженерии позволило частично заменить иммуногенные участки мышинных мкАТ на соответствующие фрагменты антител человека. В **химерных** мкАТ [45] (рис. 3) все константные домены обеих цепей антитела мыши заменены на константные домены иммуноглобулина человека, в **гуманизированных** мкАТ (рис. 3) только гипервариабельные участки, отвечающие за комплементарное взаимодействие с антигеном (CDR), имеют мышинное происхождение. С помощью генно-инженерных методов получают также моногенные конструкции гуманизированных антител [46]. В настоящее время полностью мышинные антитела применяются в небольших дозах только для радиоиммунотерапии в связи с необходимостью быстрого вывода их из кровотока (см. препараты Vexxar® и Zevalin® в табл. 2).

Более сложные технологии разработаны для получения полностью **человеческих** мкАТ (рис. 3). Методы скрининга scFv или Fab-фрагментов антител нужной специфичности из комбинаторных библиотек (фаговый, рибосомный, дрожжевой дисплей) с последующей реконструкцией из них

полноразмерных иммуноглобулинов человека не требуют предварительной иммунизации. Так, широко применяемый для терапии аутоиммунных заболеваний препарат Adalimumab (Humira®) изначально был получен как scFv-фрагмент с помощью Cambridge Antibody Technology (MedImmune), а затем восстановлен в целое антитело [47]. Полностью **человеческие** мкАТ получают также в трансгенных мышях с экспрессирующимися генами иммуноглобулинов человека. Технология заключается в замене локусов генов IgG мыши на соответствующие участки генома человека. Примером является терапевтический препарат Panitumumab (Vectibix®), специфичный к EGFR, сконструированный с помощью технологии HuMouse (фирма Abgenix).

В настоящее время эта область продолжает активно развиваться, и все множество подходов, применяемых для гуманизирования антител, можно условно разделить на рациональные и эмпирические [48]. Рациональные методы включают т.н. цикл дизайна: генерирование небольшого числа вариантов, основанных на информации о структуре антитела и его гена, затем их анализ и выбор наилучшего варианта. К ним относятся: прививка гипервариабельных участков мкАТ мыши, отвечающих за комплементарность взаимодействия (CDR-grafting), или только их небольшой части (20–30%), отвечающей за специфичность (SDR-grafting), на каркас иммуноглобулина человека [49]; моделирование поверхности мкАТ мыши с целью сделать ее максимально подобной поверхности иммуноглобулина человека (resurfacing); супергуманизация на основе выявления и удаления из молекулы иммуноглобулина мыши потенциальных эпитопов для главного комплекса гистосовместимости и Т-клеток (human string content optimization) [50]. В последнее время внимание исследователей привлекают однодоменные антитела верблюда (наноантитела) (рис. 1), которые обладают высокой стабильностью, технологичностью и способностью связывать труднодоступные антигены. Для клинического применения таких наноантител была разработана общая стратегия их гуманизирования [51]. Были выявлены аминокислотные остатки, определяющие различия наноантител и соответствующего им вариабельного домена тяжелой цепи IgG человека. Затем из репрезентативной библиотеки выделили наноантитела, которые путем точной «доводки», т.е. последовательной замены отдельных участков молекулы, были максимально приближены по своей структуре к соответствующему домену иммуноглобулина человека, т.е. гуманизированы. При этом наноантитела не потеряли своей стабильности и сохранили исходную аффинность.

В противоположность рациональным методам эмпирические методы гуманизирования антител основаны на создании больших комбинаторных библиотек [21, 22] и селекции требуемых вариантов с помощью технологий обогащения, таких как, например, фаговый, рибосомный или дрожжевой дисплей, или с помощью технологии высокопроизводительного скрининга [23]. Эти методы в большинстве своем применимы к одноцепочечным антителам (scFv), которые при необходимости могут быть превращены в моногенное мкАТ [46] (рис. 3, 8) путем слияния с константным доменом Fc и димеризации, а также реконструированы в полноразмерное антитело канонического строения.

Как правило, оба подхода дополняют друг друга. В настоящее время около 40 гуманизированных и человеческих мкАТ, полученных с помощью новых методов селекции для противораковой терапии, проходят последние стадии клинических испытаний [47]. Гуманизирование терапевтических антител не только привело к ослаблению опасных побочных эффектов, но позволило также более полно использовать мощный потенциал мкАТ, т.е. задействовать их эффекторные функции.

## 5. ОПТИМИЗАЦИЯ ЭФФЕКТОРНЫХ ФУНКЦИЙ АНТИТЕЛ

Антитела, связавшиеся с поверхностью клетки-мишени, могут вызывать ее гибель посредством запуска механизмов АЗКЦ и КЗЦ (см. выше), *рис. 2*. Далеко не для всех клинических применений мкАТ эти механизмы могут быть полезны. Например, для направленной доставки радиоиммуноизотопов или блокирования отторжения трансплантата эффекторные функции мкАТ не нужны, более того, они могут вызвать опасные осложнения. В других случаях, наоборот, действие мкАТ может быть усилено за счет привлечения клеток-киллеров. Одним из первых подходов такого рода было создание биспецифических мкАТ, дополнительно привлекающих к клеткам мишеням цитотоксические Т-лимфоциты (см. раздел 6). Кроме того, за последние годы был выявлен целый ряд рецепторов иммунных клеток, отвечающих за взаимодействие с антителами, и выяснена роль отдельных участков IgG в этом взаимодействии. Так, в недавних исследованиях было показано, что эффективность терапевтического антитела зависит от его аффинности к FcγRIIIa (CD16) и FcγRIIa (CD32), характерным активирующим рецепторам целого ряда клеток-киллеров. Оказалось, что ответ пациента на лечение препаратами мкАТ зависит от его фенотипа. Было показано, что фенотипы пациентов FcγRIIIa-158 V/V и FcγRIIa-131 H/H являются хорошим прогностическим признаком при лечении больных фолликулярной и неходжкинской лимфомой препаратом Rituxan® (Rituximab) [52]. Аналогичные результаты получены при лечении рака молочной железы препаратом мкАТ Herceptin® (Trastuzumab) [53]. С другой стороны, терапевтическое антитело может связываться с рецепторами FcR на нетоксичных клетках (тромбоциты, В-клетки), которые способны ингибировать активацию эффекторных клеток-киллеров (например, рецептор FcγRIIb на макрофагах). Действительно, было показано, что ингибиторная изоформа FcγRII ухудшает терапевтический эффект гуманизированного препарата Herceptin® (Trastuzumab) на модельных животных [54]. Приведенные данные свидетельствуют о том, что на современном этапе инженерии антител для увеличения эффективности терапевтического антитела необходимо проводить оптимизацию его эффекторных функций в зависимости от особенностей применения.

В этом контексте следует также упомянуть конструкции, в которых константная часть иммуноглобулина используется в сочетании с нацеливающими пептидами вместо антигенсвязывающих участков IgG [55] или с цитокинами в мономерном и димерном форматах для улучшения фармакокинетики и защиты от деградации [56].

Существует несколько путей оптимизации эффекторных функций антител. Для того чтобы полностью от-

ключить эти функции, используют различные варианты укороченных антител, лишенных константных доменов, отвечающих за связывание с компонентом системы комплемента C1q и клетками-киллерами (см. раздел 3). Примерами укороченных антител являются антиагреганты ReoPro® (Abciximab), Монафрам® а также блокатор ангиогенеза Lucentis® (Ranibizumab) (*табл. 2*). Другим способом является переключение субкласса антител с IgG1 на IgG2, как у противоракового препарата Vectibix® (Panitumumab), специфичного к маркеру EGFR (HER1)[57] (*табл. 2*). Константный домен IgG2 практически не связывается с рецепторами FcγR клеток-киллеров, поэтому антитела этого субкласса не способны вызвать АЗКЦ.

Более универсальный подход предполагает направленный мутагенез участков связывания константных доменов с C1q и клеточными рецепторами FcγR. Направленный мутагенез стал возможен благодаря точному картированию участков связывания FcγR на константных доменах IgG1 [58]. Был получен весь спектр мутантных мкАТ от практически несвязывающихся с FcγR и C1q и потому неспособных вызвать АЗКЦ и КЗЦ до высокоаффинных мкАТ, вызывающих весь набор реакций по этим двум механизмам [59-61]. Были получены также варианты мкАТ, не способные связываться с C1q и потому не вызывающие каскад реакций комплемента, но сохранившие высокую аффинность связывания с рецепторами FcγR и способность вызывать АЗКЦ [50]. Важным результатом этой работы стало получение мутантных мкАТ (S239D/I332E/A330L), способных хорошо связываться не только с менее распространенным гомозиготным аллелем FcγRIII-158V/V (20 % больных), но и с более распространенными аллелями FcγRIII-158V/F (45 % больных) и FcγRIII-158F/F (35 % больных). Конструирование терапевтических антител с эффекторными функциями, не зависящими от полиморфизма пациентов, открывает путь к распространению успеха лечения такими препаратами, как Herceptin® (Trastuzumab) и Rituxan® (Rituximab).

Углеводный компонент составляет всего 3 % от общей массы IgG (*рис. 1*), но, несмотря на малое процентное содержание, играет важную роль в осуществлении эффекторных функций антитела. IgG содержит две разветвленные олигосахаридные цепи, каждая из которых через атом азота присоединена к остатку Asn297 в CH2-домене константной части (*рис. 3*). Состав углеводного компонента иммуноглобулинов имеет высокую видоспецифичность, а также варьирует внутри вида. Гликозилирование неприродных (или сконструированных) антител зависит от системы, в которой они получены, выбранного клона, системы выделения. Поэтому «неправильное» гликозилирование терапевтических антител, полученных в ксеногенных системах (см. раздел 8), может вызывать у человека иммунный ответ, аллергические реакции, а также способствовать быстрому выведению этих антител из кровотока [62]. Известно также, что олигосахариды (гликаны) в составе IgG являются ключевыми компонентами для оптимального связывания константной части IgG с рецепторами FcγR, опосредствующими эффекторные функции. Недавно было показано, что удаление фукозы из углеводного компонента антитела более чем в 50 раз усиливает АКЗЦ [63]. Снижение эффективности антител в организме по сравнению

с опытами *in vitro*, заставляющее повышать концентрации вводимого препарата, связано с ингибирующим эффектом фукозилированных иммуноглобулинов плазмы крови [64]. Нефукозилированные терапевтические антитела обладают большей аффинностью к рецепторам FcγR по сравнению с фукозилированными, что позволяет им противостоять ингибирующему эффекту IgG, циркулирующих в плазме, и проявлять свое действие при меньших концентрациях [65].

Все терапевтические антитела, допущенные к применению в клинике, производятся в настоящее время в клетках CHO, миеломных клетках мыши NS0 и SP2/0 и мышечных гибридах. Почти все из них имеют фукозилированный углеводный компонент и, как следствие, АКЗЦ, далекую от оптимальной [66]. Фукозилирование углеводного компонента IgG осуществляется в клетках млекопитающих фермента α-1,6-фукозилтрансферазой (FUT8). Некоторые мышечные клеточные линии имеют сниженный по сравнению с клетками CHO уровень этого фермента. Однако наиболее эффективным способом удаления фукозы является необратимая инактивация гена FUT8. Так были сконструированы клеточные линии CHO с нокаутированным геном FUT8, позволяющие получать нефукозилированные терапевтические антитела с АКЗЦ, увеличенной в 50–100 раз [67]. Прояснение роли углеводного компонента IgG дало мощный импульс новому направлению в инженерии антител, и в настоящее время технологии конструирования антител, затрагивающие углеводный компонент, интенсивно развиваются [68]. Это направление представляется одним из самых обещающих для конструирования следующего поколения терапевтических антител с улучшенными свойствами.

## 6. БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА

Природные антитела моноспецифичны, т.е. связываются с антигеном только одного вида. Технологии инженерии антител позволяют создавать для разных клинических применений биспецифические антитела (рис. 3, 2, 4, 5, 8), объединяя в одной молекуле специфичность к двум разным антигенам [29, 69]. Первые биспецифические антитела были получены путем слияния двух гибридных клеточных линий. Полученная в результате квадромы продуцирует случайную смесь целевого биспецифического антитела и исходных антител и требует последующего сложного выделения нужного варианта. Несколько подходов были предложены для увеличения выхода биспецифических молекул, в т.ч. получение межвидовой квадромы мышшь-крысы с преимущественным спариванием легкой и тяжелой цепей из одного вида [70], а также изящная технология «застежки-кнопки» (англ. «knob-and-holes») [32]. В СНЗ-домены мкАТ были введены два вида мутаций: «кнопка» – с заменой небольшого аминокислотного остатка (треонин) на объемный (тирозин) и «гнездо для кнопки» – с противоположной заменой. В результате слияния гибридов, производящих два вида антител, преимущественно образовывались биспецифические молекулы, которые могли зашелкнуться с помощью «застежки-кнопки». Распространенным методом получения биспецифических антител до сих пор остается химическая конъюгация [71], несмотря на такие недостатки, как необходимость химических моди-

фикаций, не всегда безвредных для соединяемых антител, и проблема разделения получившихся вариантов.

Методы генной инженерии позволяют получать биспецифические мкАТ и их фрагменты, обходя проблему разделения сложной смеси продуктов [9]. Для этого традиционно используют стрептавидин-биотиновую систему, имеющую самую высокую прочность комплекса с константой диссоциации компонентов  $K_D$   $10^{-15}$  М. Мы предложили использовать в качестве гетеродимеризационного модуля белковую пару барназа:барстар (рис. 3, 4, 5), которая практически не уступает стрептавидин-биотиновой системе по прочности комплекса с  $K_D$   $10^{-14}$  М, но позволяет получать биспецифические антитела с точным соотношением 1:1 или 1:2 (тример) и не требует химической модификации компонентов [72], что очень важно для таких тонко устроенных белков, как антитела. Недавно для создания биспецифических антител разработан красивый метод «замка на причале» (англ. «dock and lock» – DNL-method) [33] (см. также раздел 7). Хорошие фармакокинетические характеристики и двухвалентное связывание с поверхностным антигеном делают полученные этим методом антитела перспективными агентами для радиоиммунотерапии. В то же время недостатком этого метода является относительно невысокая аффинность комплекса ( $K_D \sim 10^{-9}$ ), что требует его дополнительной стабилизации дисульфидными связями.

Первоначально биспецифические антитела использовались для перенацеливания цитотоксических иммунных клеток на патологические мишени. Было создано множество биспецифических антител, один узнающий домен которых связывался с каким-либо характерным поверхностным маркером раковой клетки, а другой – с активирующим рецептором цитотоксических клеток [69, 73]. В качестве таких рецепторов, привлекающих цитотоксические клетки к мишени, были испробованы рецептор IgG FcγRI (CD64), характерный для моноцитов, макрофагов и дендритных клеток, и рецептор IgA FcαRI (CD89), экспрессирующийся преимущественно на нейтрофилах, макрофагах и эозинофилах, а также маркер CD3 цитотоксических Т-лимфоцитов. Стоит отметить, что Т-лимфоциты, одни из самых мощных киллерных клеток, не могут быть привлечены антителами, так как лишены рецепторов Fcγ. К сожалению, клинические испытания выявили неэффективность такого подхода. Иммунные клетки требовали дополнительной активации, эффект проявлялся при 40–100-кратном превышении фактора над числом клеток-мишеней и высокой дозе препарата, наблюдалась высокая дозозимитирующая токсичность препаратов [73, 74]. Использование биспецифических антител для привлечения к раковым мишеням цитотоксических Т-клеток посредством связывания с CD3 давало эффект только при местном применении [75] или при адаптивном переносе Т-клеток, обработанных биспецифическими антителами *ex vivo* [76].

Почти все эти ограничения удалось преодолеть с помощью нового поколения антител формата BiTE (англ. **Bi**specific **T**-cell **E**ngager), которые представляют собой рекомбинантные биспецифические одноцепочечные антитела, состоящие из двух scFv-фрагментов, специфичных к поверхностному антигену клетки-мишени и Т-клеточному антигену CD3. В отличие от вышеупомянутых полноразмерных биспецифических мкАТ, антитела BiTE не требу-

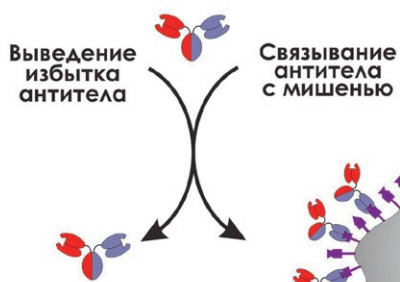
ют дополнительной активации привлекаемых иммунных клеток и обладают цитотоксичностью при гораздо меньших концентрациях [77, 78]. Очевидно, что биспецифичные мкАТ, перенацеливающие иммунные клетки, – это перспективное направление, особенно для лечения раковых заболеваний крови: клинические исследования показали, что препарат Blinatumomab (анти-CD19/анти-CD3) в концентрации 0.005 мг/м<sup>2</sup>/день приводит к полной элиминации раковых В-лимфоцитов из кровотока у больных неходжкинской лимфомой [79].

Аналогичные подходы с применением биспецифических антител были использованы для перенацеливания стволовых клеток, вирусов и патогенов. Так, для привлечения стволовых клеток в миокард модельного животного при инфаркте и для восстановления васкуляризации предложено использовать биспецифические антитела, узнающие рецептор стволовых клеток CD45, и антигены, которые становятся доступными при поражении миокарда [71]. Такой подход позволяет доставить к месту поражения гораздо большее число клеток, чем при инъекции суспензии стволовых клеток непосредственно в миокард. Биспецифические антитела пробовали применять также для направленной доставки к опухоли аденовирусов с целью генотерапии [80] и для удаления патогенов из кровотока посредством их

перенацеливания на рецептор комплемента CR1 на эритроцитах [81]. Исследования такого рода еще предстоит довести до клинических испытаний.

Вторая большая область клинического применения биспецифических антител – это предварительное нацеливание (англ. pre-targeting) с последующей направленной доставкой токсинов, химиотерапевтических агентов и радиоактивных изотопов к раковым клеткам (рис. 4). Идея предварительного нацеливания на мишень с последующим ее поражением «по наводке» порождена желанием максимально снизить общий токсический эффект при использовании сильных токсинов или радионуклидов как за счет меньшего времени циркуляции в крови, так и за счет снижения терапевтической концентрации токсина. Для этого на первом этапе в организм вводятся антитела, нацеленные на поражаемую мишень, например, опухоль, а затем после естественного выведения несвязавшихся с мишенью антител вводят второй, цитотоксический, компонент (токсин, радионуклид), специфически связывающийся с введенными антителами (рис. 4). Вначале было предложено использовать для предварительного нацеливания немеченые биспецифические антитела, связывающиеся одной валентностью с опухолевым антигеном, а другой – с гаптеном, несущим радиоактивный изотоп [82]. Недостатком

### (1) Предварительное нацеливание



### (2) ADEPT

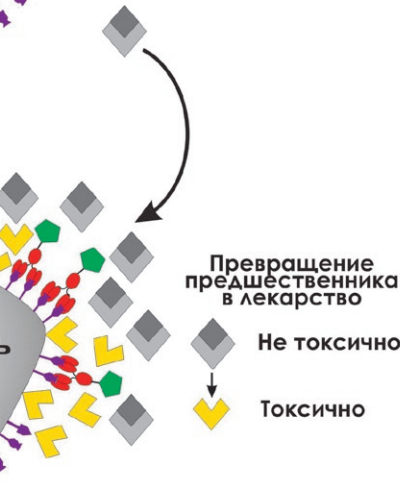
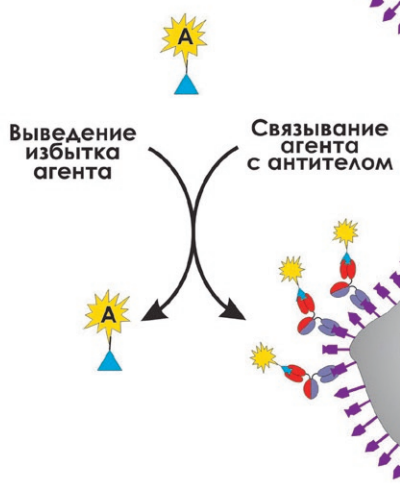
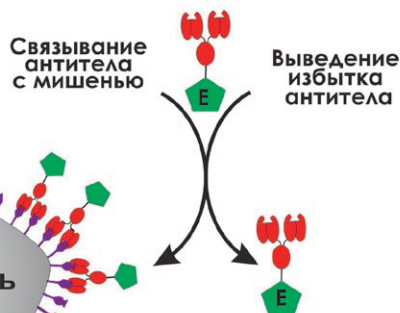


Рис. 4. Схема двухстадийных технологий поражения мишеней. (1) Предварительное нацеливание (англ. pre-targeting) с помощью антител с последующим поражением мишени привлеченным агентом А. (2) Предварительная доставка к мишени специального фермента Е, который на второй стадии превращает неактивный предшественник лекарственного средства в активную форму – ADEPT (англ. – Antibody-Directed, Enzyme Pro-drug Therapy)

метода является одновалентное, а значит, неоптимальное связывание с антигеном, а также относительно низкий выход биспецифических антител, получаемых из клеток миеломной линии. Методы генетической инженерии позволили сконструировать для радиоиммунотерапии целый ряд укороченных фрагментов антител, в т.ч. в мультивалентном формате (см. разделы 1, 2 и 7), что позволило значительно улучшить фармакокинетические характеристики нацеливающих антител, а также специфичность и разрешение метода [83].

Третье направление, требующее конструирования биспецифических антител – это одновременное связывание двух разных антигенных детерминант на одной мишени. Высокая плотность поверхностного антигена на клетках-мишенях по сравнению с другими, непатогенными клетками – это неперемное условие использования этого антигена для нацеливания, обеспечивающее специфичность воздействия на мишень и безопасность для целого организма. Часто число молекул на клеточной поверхности недостаточно велико. В этом случае одним из способов увеличить специфичность нацеливания на раковую клетку и время удерживания антител на мишени является конструирование биспецифических антител, одновременно связывающихся с двумя разными опухоль-ассоциированными антигенами, экспрессированными на одной и той же раковой клетке [72, 84]. Этот подход важен еще и потому, что дополнительные поверхностные антигены могут возникать в процессе лечения в ответ на блокирование рецепторов EGFR или HER2/neu и обуславливать резистентность к таким лекарственным препаратам, как Trastuzumab, Cetuximab и Panitumumab. Недавно было показано, что одним из механизмов резистентности может быть избыточное присутствие других тирозинкиназных рецепторов (IGF-RI, c-MET, Ron и др.), запускающих те же сигнальные пути, что EGFR и HER2/neu, в обход заблокированных рецепторов [85]. Применение биспецифических антител для одновременного блокирования EGFR и IGF-1R значительно усилило ответ раковых клеток по сравнению с воздействием антител только одного вида [12]. Такое комбинированное воздействие сразу на несколько поверхностных антигенов может блокировать избыточные сигнальные пути в раковой клетке и приводить к более благоприятному клиническому результату. Суммарный эффект производят также биспецифические антитела в формате «внутренних антител» (англ. intrabody), специфичных к рецепторам ангиогенеза VEGF-R2 и Tie-2. Одновременное блокирование двух путей ангиогенеза с помощью таких антител значительно усиливает ингибирование ангиогенеза и роста опухоли по сравнению с блокированием лишь одного пути [86].

## 7. ИММУНОКОНЬЮГАТЫ

Стремление реализовать идею «магической пули» и недостаточная эффективность «ненагруженных» антител по отношению к мишеням побудили исследователей к конъюгированию антител с другими эффекторными молекулами (рис. 3): радиоизотопами, токсинами, интерлейкинами, ферментами, активирующими лекарственные препараты и т.д.). В таких иммуноконъюгатах антитела обычно выступают в качестве нацеливающего компонента, доставляющего к мишени действующий (цитотокси-

ческий) или диагностический агент. Для присоединения низкомолекулярных агентов, например, радиоизотопов или низкомолекулярных флуоресцентных красителей, традиционно используют химические методы конъюгации [11, 87]. Для улучшения проникновения радиоиммуноконъюгатов в опухоль к антителам генно-инженерным способом присоединяют функционально активные пептиды (CPP – cell-penetrating peptides), способные не только проникать через мембрану, но и переносить другие белки внутрь клетки. Среди них наиболее эффективны пептидин, представляющий собой олигопептид (43-58 а.о.) из гомеодомена белка Antp дрозофилы, и TAT – олигопептид (49-57 а.о.) из трансактиватора транскрипции ВИЧ. Показано, что радиоиммуноконъюгаты на основе мини-антител, специфичных к опухолевому антигену TAG72, снабженные пептидином или олигопептидом TAT, в 2.5-3 раза лучше накапливаются в опухолях ксенографтных мышей [88].

В онкологической практике приняты для применения два препарата для радиоиммунотерапии неходжкинской лимфомы: Веххаг<sup>®</sup>, представляющий собой IgG2a мыши, конъюгированный с бета-эмиттером средней энергии <sup>131</sup>I (радиус проникновения 1 мм) и Zevalin<sup>®</sup> – IgG1 мыши, конъюгированный с бета-эмиттером высокой энергии <sup>90</sup>Y (радиус проникновения 11 мм) (табл. 2). В настоящее время активно ведутся работы для замены мышиных антител в качестве нацеливающих агентов для радиоиммунотерапии на менее иммуногенные фрагменты (см. раздел 3), а также разрабатываются технологии предварительного нацеливания (pre-targeting) для снижения общей радиационной нагрузки на организм (см. раздел 6).

В этом случае, так же как и для создания биспецифических антител, необходим гетеродимеризационный модуль. В настоящее время для этой цели применяют стрептавидин-биотиновую систему [89], хорошо себя зарекомендовавшую для целого ряда аналитических приложений. Однако ее применение в организме человека ограничено присутствием большого количества эндогенного биотина, который может конкурировать с биотинилированными компонентами. Нами предложена новая стратегия двухстадийной доставки, основанная на рибонуклеазе барназе и ее природном ингибиторе, барстаре [30, 31]. Как упоминалось выше, эти два маленьких белка (110 и 89 а.о.) образуют комплекс ( $K_D \sim 10^{-14}$  М), сравнимый по прочности со стрептавидин-биотиновой системой [90]. Они стабильны, хорошо растворимы и устойчивы к протеазам, что делает их совместимыми с бактериальной системой экспрессии. N- и C-концы обоих белков расположены вне области их взаимодействия и доступны для генно-инженерного слияния с нацеливающими мини-антителами и цитотоксическими агентами [91, 92]. Принципиальная возможность двухстадийной доставки действующего агента к раковым клеткам показана на примере рекомбинантных мини-антител, специфичных к раковому поверхностному антигену HER2/neu и слитых с барстаром, и визуализирующего компонента – рекомбинантного флуоресцентного белка EGFP, слитого с барназой [31]. Важными преимуществами модуля барназа:барстар являются точное соотношение 1:1 компонентов в комплексе и полное отсутствие их самоагрегации, а также высокая аффинность взаимодействия, превосходящая значения всех других димеризационных систем,

за исключением стрептавидин-биотиновой. Но, в отличие от стрептавидин-биотиновой системы, использование гетеродимеризационного модуля барназа:барстар основано на генно-инженерных технологиях и не требует никаких ковалентных модификаций.

Из других методов, разрабатываемых для предварительного нацеливания на мишень, большой интерес представляет метод «замка на причале» (англ. «dock and lock» – DNL-method) [33]. Эта технология основана на специфическом белок-белковом взаимодействии димерной регуляторной субъединицы RII цАМФ-зависимой протеинкиназы и заякоривающего домена (амфипатическая спираль из 14-18 а.о.) якорного белка киназы А. На основе этих полипептидов и Fab-фрагментов двух разных антител сконструировано трехвалентное биспецифическое антитело, узнающее опухолевый антиген СЕА (карциноэмбрионный антиген) и гаптен гистамин-сукцинил-глицин. На первом этапе направленной доставки (рис. 4) «причаливающий» компонент обеспечивает двухвалентное взаимодействие с опухолевым антигеном, на втором этапе «замок», соединенный заякоривающим доменом с «причалом», связывается с гаптенем, меченным радиоактивным  $^{99m}\text{Tc}$ . Относительно невысокая аффинность комплекса ( $K_D \sim 10^{-9}$ ) требует его дополнительной стабилизации дисульфидными связями. К недостаткам следует также отнести сложность конструкции трехвалентного антитела – для сборки комплекса требуется пять видов белковых цепей. Несмотря на эти трудности, предварительное нацеливание позволило в ~25 раз увеличить накопление радиоактивной метки на привитых опухолях у мышей по сравнению с одностадийным введением [33]. В настоящее время этот метод претендует на то, чтобы заменить традиционно применяемые для предварительного нацеливания биспецифические мкАТ и стрептавидин-биотиновую систему [89]. Действительно, для этого приложения трехвалентные биспецифические антитела, полученные методом «замка на причале» имеют ряд неоспоримых преимуществ: двухвалентное связывание с опухолевым антигеном, что усиливает взаимодействие и увеличивает время удерживания на патогенных клетках; отсутствие эффекторных функций антитела, что значительно уменьшает нежелательные побочные действия; быстрое выведение из организма нацеливающего компонента, что уменьшает время ожидания второго этапа – введения собственно радиоактивного изотопа – с 6-7 дней до нескольких часов [93].

Большое число исследований посвящено использованию мощных токсинов различной природы для направленного воздействия на клетки мишени, 44 % препаратов против опухолевых антител, проходящих клинические испытания, являются иммуноконъюгатами или рекомбинантными белками. При этом лишь один препарат, Mylotarg<sup>®</sup>, представляющий собой гуманизированное анти-CD33-антитело Gentuzumab, химически конъюгированное с цитотоксическим антибиотиком калихеамицином, принят для клинического применения (табл. 2). Такая диспропорция отражает объективные трудности, с которыми встретились исследователи при разработке этой привлекательной идеи. Для иммунотоксинов, сконструированных на основе бактериальных токсинов или антибиотика доксорубина, на первых этапах исследований была характерна высокая

системная токсичность и большое число побочных эффектов. Применение антител, нагруженных мощными токсинами, требует гораздо более внимательного подхода к выбору мишени, поскольку необходимо полностью избежать доставки цитотоксических агентов к нормальным клеткам. Предпочтительно нацеливать иммунотоксины на антигены, не экспрессирующиеся на нормальных клетках, но с очень высоким уровнем экспрессии на поверхности опухолевых клеток. Несвязавшийся иммунотоксин должен быстро выводиться из кровотока. Желательным является быстрая интернализация антигена после связывания с иммунотоксином. Кроме того, поскольку эффективность лекарства напрямую связана с уровнем токсичности соединения, целесообразно применять токсины с уровнем  $IC_{50}$ , лежащим в пределах нано- и пикомолярных концентраций. В арсенале исследователей на сегодняшний день это ауристатины, мейтанзиноиды, калихеамицины и белковые токсины: рицин, псевдомонадный и дифтерийный токсины [94].

Все эти представления приняты во внимание при конструировании препарата Mylotarg<sup>®</sup> (табл. 2). Поверхностный антиген CD33, к которому специфично гуманизированное мкАТ Gentuzumab, гиперэкспрессируется на поверхности злокачественных клеток при острой миелоидной лейкемии, поэтому максимальная доза препарата, при которой еще не проявляется токсичность, довольно высока – 9 мг/м<sup>2</sup>. CD33 быстро интернализуется, и терапевтический ответ зависит не от уровня экспрессии антигена, а от стадии клеточного цикла и уровня множественной устойчивости к лекарствам (multi-drug resistance). Цитотоксический компонент этого иммунотоксина – антибиотик калихеамицин, который связывается с малой бороздкой ДНК и вносит в нее разрывы. Токсичность этого антибиотика характеризуется величиной  $IC_{50}$  в пределах низкой нМ концентрации.

Цитотоксичность антибиотиков группы ауристатинов и мейтанзиноидов имеет другую природу. Они связываются с  $\alpha$ -тубулином и нарушают полимеризацию микротрубочек, что приводит к остановке клеточного цикла и клеточной смерти. В качестве мишеней для иммуноконъюгатов используют клеточные маркеры CD20, CD30, CD70, PSMA (prostate specific membrane antigen), HER2/neu, E-селектин и LewisY. Так же как и в случае радиоиммунотерапии, иммуноконъюгаты имеют больший эффект при лечении гематологических видов рака и не эффективны для лечения солидных опухолей.

В настоящее время клинические испытания проходят также иммунотоксины на основе укороченного псевдомонадного экзотоксина А и дифтерийного токсина. Механизм их действия основан на каталитическом АДФ-рибозилировании фактора 2, ингибирующего трансляцию. Первое и второе поколение этих мультидоменных белков обладало чрезвычайной системной токсичностью, которая была значительно снижена после удаления доменов, отвечающих за связывание с клетками. Преимуществом этих белков является их сильная токсичность в пМ концентрациях – чтобы убить клетку, требуется всего несколько молекул. Недостатком является иммуногенность и наличие побочного эффекта – синдрома повышенной проницаемости сосудов. Для преодоления иммуногенности в группе одного из пионеров исследований по иммунотоксинам А.



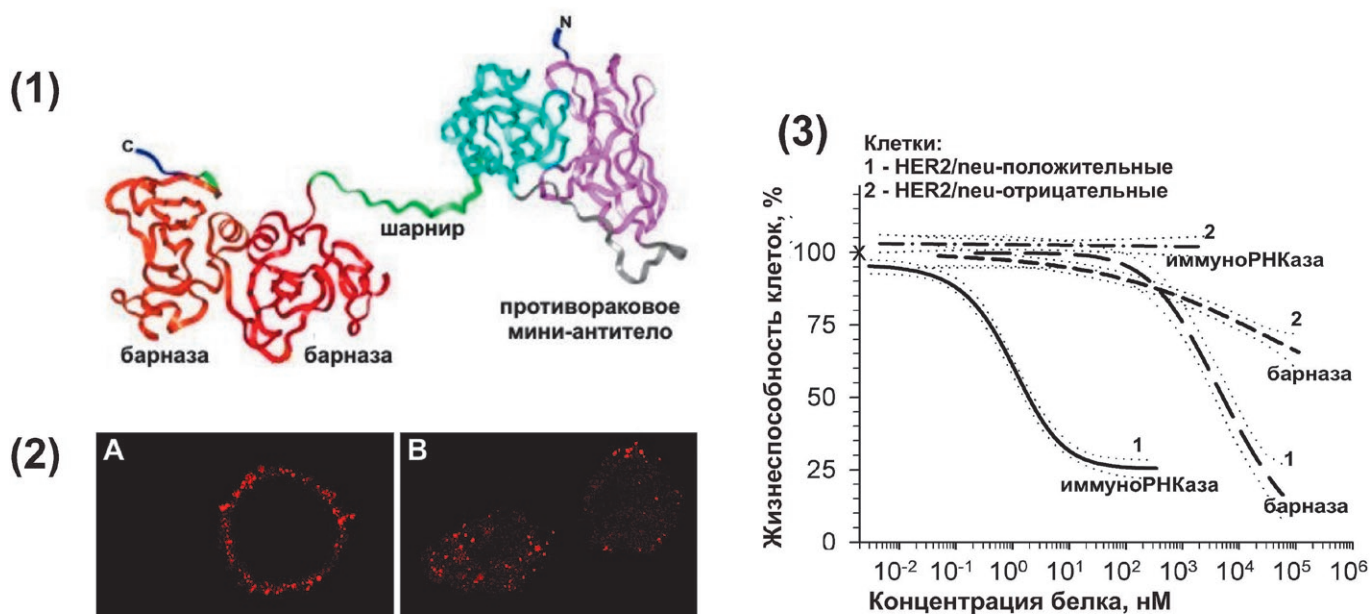


Рис. 5. Иммунодибарназа – перспективный агент для терапии опухолевых новообразований [105]. (1) Схема структуры иммунодибарназы. (2) Взаимодействие иммунодибарназы с клетками, экспрессирующими раковый маркер HER2/neu: поверхностное связывание при 4 °С (а) и интернализация при 37 °С (б). (3) Цитотоксичность иммунодибарназы для клеток с гиперэкспрессией ракового маркера HER2/neu

Пастана была проведена скрупулезная работа по деиммунизации укороченного псевдомонадного экзотоксина PE38 с полным сохранением токсичности [95]. Высокая интенсивность работ по созданию лекарственных препаратов на основе иммунотоксинов позволяет надеяться на их скорое поступление в распоряжение врачей.

Попытки использования РНКаз в качестве токсинов начались гораздо позже, в конце 1990-х гг. Были получены конъюгаты бычьей панкреатической РНКазы и мышечных антител против EGFR [96] и рекомбинантный белок на основе человеческой панкреатической РНКазы и одноцепочечных мини-антител к трансферриновому рецептору [97]. Для снижения иммуногенности человеческая панкреатическая РНКаза была слита с гуманизированным мини-антителом [98]. Эти же авторы впервые предложили термин иммуноРНКаза. Сегодня наблюдается взрыв интереса к иммуноРНКазам [99–102]. РНКазы привлекают исследователей своей доступностью, низкой иммуногенностью и отсутствием токсичности вне клетки. Это позволяет надеяться на отсутствие системной токсичности препаратов на основе РНКаз, но добавляет проблему интернализации в клетки-мишени. Применение РНКаз человеческого происхождения значительно лимитировано ингибированием их природным ингибитором (RI), присутствующим в клетках. Путем направленного мутагенеза были получены мутанты человеческой РНКазы, устойчивые к ингибитору [103], а также продолжен поиск подходящих РНКаз другого происхождения [104]. В настоящее время успешно завершаются клинические испытания онкоказы – первой РНКазы, примененной для терапии рака [105]. Это небольшой положительно заряженный белок (104 а.о.) лягушки принадлежит к суперсемейству рибонуклеаз А амфибий

и оказывает цитостатическое и цитотоксическое действие преимущественно на раковые клетки. Такая избирательность, вероятно, связана с сильным положительным зарядом онкоказы и быстрым метаболизмом раковых клеток [105].

В нашей лаборатории для создания иммунотоксина использована бактериальная рибонуклеаза барназа [30, 45, 106, 107]. Этот небольшой, устойчивый и хорошо растворимый белок нечувствителен к природному ингибитору РНКаз человека. Ранее мы показали, что в составе мультидоменных рекомбинантных белков барназа играет роль внутреннего шаперона, обеспечивает правильное сворачивание отдельных доменов, способствует устойчивости и хорошей растворимости всего белка [108]. Барназа токсична для клеток и была использована нами для создания вектора с «нулевым» фоном [90]. Сконструированная нами иммунодибарназа содержит две молекулы барназы и гуманизированное мини-антитело, специфичное к интернализируемому раковому маркеру HER2/neu (рис. 5, 1). В экспериментах *in vitro* показано, что оснащение токсического агента барназы адресующим мини-антителом существенно увеличивает эффективность ее воздействия на раковые клетки. Противораковое миниантитело не только доставляет барназу на поверхность раковых клеток (рис. 5, 2а), но и обеспечивает ее проникновение внутрь клетки (рис. 5, 2б), где она проявляет свое токсическое действие. Иммунодибарназа в концентрации 1.8 нМ вызывает апоптоз 50 % HER2/neu-положительных клеток, тогда как для подобного воздействия на HER2/neu-отрицательные клетки требуется концентрация в 250–300 раз больше (рис. 5, 3). Цитотоксический эффект барназы, лишенной адресующего мини-антитела, неспецифичен и в ~1000 раз меньше, чем

цитотоксический эффект иммунодибарназы (рис. 5, 3) [107]. Специфичность воздействия на раковые клетки и низкая действующая концентрация иммунодибарназы свидетельствуют о ее перспективности в качестве агента для терапии опухолевых новообразований.

РНКаза, циркулирующая в кровяном русле, нетоксична для организма и приобретает цитотоксичность, лишь проникнув в раковую клетку, являясь, в определенном смысле, предшественником токсина (англ. pro-toxin) [99]. Аналогичная идея создания неактивного предшественника лекарства, которое можно доставить к мишени и там превратить в активную форму, разрабатывается в различных вариантах технологии ADEPT (англ. **Antibody-Directed, Enzyme Pro-drug Therapy**) (рис. 4). Технология основана на предварительной направленной доставке фермента, конъюгированного с антителом, к клеткам-мишеням. Направленность доставки обеспечивается специфичностью антител к клеточному антигену. На следующем этапе вводится неактивный предшественник лекарства, который лишь в микроокружении мишени конвертируется ранее доставленным ферментом в активную форму и убивает близлежащие клетки. В качестве ферментов в этом подходе используют  $\beta$ -лактамазу, карбоксипептидазу G2 и др. [86, 109, 110].

Создание антиидиотипических антител с определенными каталитическими функциями – абзимов, которые одновременно обладают как функциями антитела, так и ферментативной активностью, является новым перспективным направлением. Модификации scFv-фрагментов таких антител в сочетании с применением фаговых библиотек позволяют отбирать абзимы с заранее заданными свойствами [111, 112].

Некоторые цитокины, например IL-2, IL-12, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , GM-CSF, обладают иммуномодулирующим и противоопухолевым действием. К сожалению, непосредственное использование этих белков в качестве лекарств вряд ли возможно из-за их высокой системности токсичности в действующих концентрациях, быстрого распада и выведения из организма, а также из-за ненаправленного и неспецифичного воздействия на опухолевые клетки. Создание конъюгатов антител с цитокинами – иммуноцитокинов – позволяет преодолевать указанные ограничения. Наиболее продвинулись исследования терапевтических и адьювантных свойств интерлейкина-2. Например, обнадеживающие результаты получены при клинических испытаниях рекомбинантных иммуноцитокинов, сконструированных на основе интерлейкина-2 и гуманизированных антител к раковым маркерам (дисialogанглиозид GD2, epithelial cell adhesion molecule EpCAM) и к маркеру ангиогенеза (EDB – extra domain B of fibronectin) – для лечения меланомы, нейробластомы и неходжкинской лимфомы [113, 114], а также интерлейкина-2, слитого с антителами к клеточному маркеру CD20, для лечения злокачественных В-клеточных лейкозов [115]. Применение иммуноцитокинов способствует также усилению терапевтических эффектов при химиотерапии [116].

Конъюгаты антител с различными флуоресцентными метками широко применяются в иммунологии для исследований *in vitro*. Введение в молекулярную биологию такого мощного инструмента, как флуоресцентные белки (Нобелевская премия 2008 г. – Dr. Osamu Shimomura, Dr. Martin

Chalfie, Dr. Roger Y. Tsien), позволяет в реальном времени следить за процессами в живых клетках. Исследователи из Японии создали систему для визуализации живых раковых клеток непосредственно в организме, основанную на pH-активируемом флуоресцентном агенте, направляемом в клетку-мишень с помощью противоракового интернализирующегося антитела [117]. Флуоресценция наблюдается лишь при попадании агента в лизосомы живой раковой клетки и исчезает при ее гибели. Специфичность метода составила 99 %. Это исследование пока еще далеко от клинического применения, но свидетельствует о новых возможностях иммуноглобулиновых конъюгатов.

## 8. СИСТЕМЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИТЕЛ

Производство стабильных и высокоаффинных мкАТ в достаточных количествах для предклинических и клинических исследований является на сегодняшний день узким местом для широкого применения этого класса терапевтических соединений. Быстро возрастающий спрос на антитела и на их качество привел к развитию огромного числа разнообразных систем для продукции антител и их фрагментов на основе грам-положительных (*Bacillus*) и грам-отрицательных (*Escherichia*) бактерий, дрожжей, нитчатых грибов, клеточных линий насекомых и млекопитающих [118–120]. Высокотехнологичные системы, такие как бактериальные и дрожжевые продуценты, позволяющие наращивать биомассу в ферментерах и получать рекомбинантные белки с высоким выходом, хорошо совместимы с задачами наработки укороченных фрагментов мкАТ, негликозилированных Fab-фрагментов и scFv, как правило, снабженных специальными концевыми пептидами для быстрого выделения на аффинных сорбентах. В последнее время антитела стали получать в трансгенных растениях и животных, которые особенно подходят для наработки полноразмерных антител [72, 121]. В то же время для быстрой наработки и селекции полноразмерных антител создана система экспрессии на поверхности бактериальных клеток (т.н. «E-клонированные» антитела; англ. «E-clonal» antibodies), применимая для полноразмерного и дивалентного формата [122]. Характер гликозилирования антител в дрожжах, растениях, насекомых отличается от гликозилирования, видоспецифичного для человека, и поэтому антитела, полученные в таких системах, применимы только для экспериментальных исследований. В настоящее время антитела для клинического применения производят в трансгенных мышцах, у которых иммуноглобулиновые локусы инактивированы и заменены генами иммуноглобулинов человека [10, 123]. Наиболее известны трансгенные линии мышей Xenomouse (Abgenix; www.abgenix.com); HuMab mouse (GenPharm; www.genpharm.ca); TC mouse and KM mouse (Kirin Brewery Company; www.medarex.com). Для мкАТ, полученных в таких продуцентах, значительно снижен риск высокой иммуногенности препаратов, обусловленный ксеногенными посттрансляционными модификациями, в первую очередь, особенностями гликозилирования. Наряду с этим, разрабатываются новые технологии, позволяющие получать мкАТ с человеческим профилем гликозилирования в дрожжах, насекомых и трансгенных растениях [124, 125].

## 9. ВЫВОДЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

В начале этого века, через столетие после присуждения Нобелевской премии основоположникам современной теории иммунитета Илье Мечникову и Паулю Эрлиху (1908 г.), произошел качественный скачок в познании тонких молекулярных механизмов функционирования антител и их взаимодействия с защитными системами организма. Он обусловлен резко возросшими возможностями инструментального обеспечения экспериментальных научных исследований, накоплением и систематизацией большого количества информации. Успехи биоинформатики позволяют проводить моделирование соединений с заранее заданными свойствами, а революционный прогресс в технологиях генетической и клеточной инженерии – создавать биотехнологические продуценты терапевтических препаратов.

Современные технологии позволяют видоизменять свойства антител в зависимости от их предназначения и привлекать все их функции. С помощью генно-инженерных подходов исследователям удастся разбирать антитела на составные части и собирать из них нужные конструкции. Укороченный формат антител, сфокусированный на функции связывания с мишенью, совместимый с бактериальной экспрессией, используется для получения широкого набора соединений, предназначенных для высокоэффективной доставки действующих агентов. Созданы клонотеки иммуноглобулиновых фрагментов и высокоэффективные системы их скрининга. Наряду с этим развилось целое направление конструирования альтернативных антителам каркасных молекул, скафолдов, обладающих аналогичной способностью специфического связывания. Это область безусловно будет развиваться как в направлении конструирования нового поколения рекомбинантных укороченных гуманизированных антител с мультивалентным связыванием, обладающих улучшенными фармакокинетическими характеристиками [34, 126], так и в направлении альтернативных каркасных конструкций [127]. Широкое применение укороченные антитела, лишенные константных доменов, находят в радиоиммунотерапии для направленной доставки радиоактивных изотопов, как компоненты иммунотоксинов для онкологии, как специфические блокаторы мишеней в кардиохирургии и др.

Огромный потенциал имеют биспецифические антитела как в укороченном, так и в полномразмерном формате. В радиоиммунотерапии они применяются уже довольно давно, и новые технологии позволяют лишь модифицировать и улучшить существующие и хорошо себя зарекомендовавшие методы одно- и двухстадийной доставки радиоизотопов к мишени [93]. Напротив, успешное применение биспецифических антител в области клеточной иммунотерапии только начинается [128], и здесь открывается широкое поле для экспериментальных и клинических исследований. Высокая изменчивость раковых клеток и проблема их резистентности к терапии вызывает необходимость комплексного лечения и применения сразу нескольких препаратов с разным механизмом действия. Здесь также незаменимы

биспецифические антитела, одновременно поражающие две мишени или блокирующие два метаболических пути.

Более новым и бурно развивающимся направлением являются технологии, позволяющие управлять функциями константного домена антител. Развитие инженерии константного домена и, в частности, инженерии углеводного компонента мкАТ означает возвращение «на круги своя» и возрождение интереса именно к эффекторным функциям антитела и к полномразмерному формату мкАТ для привлечения в патологический очаг всех защитных систем самого организма [129].

Одним из направлений, очень перспективным в технологическом отношении, является создание гибридных биосовместимых наночастиц из материалов органического и неорганического происхождения. Оснащение таких наночастиц фрагментами антител будет обеспечивать высокоточное нацеливание, а доставленные с их помощью полупроводниковые флуоресцентные кристаллы («квантовые точки»), магнитные наночастицы, коллоидное золото, производные фуллеренов и др., с одной стороны, будут служить носителями лекарственных соединений, с другой – позволят осуществлять дополнительное внешнее воздействие на мишени с помощью лазерного, акустического, СВЧ и других видов электромагнитного излучения [130, 131]. Это новое поколение мультифункциональных наноконструкций должно обладать совокупностью свойств, которые трудно или нельзя использовать по отдельности. Такое комбинированное воздействие на опухоли позволит реализовать принцип «целое больше, чем сумма составляющих его частей».

В настоящее время из 266 применяющихся лекарственных мишеней, найденных в геноме человека, только 15 используются в качестве антигенов при конструировании терапевтических антител для лечения различных заболеваний, и почти все они являются поверхностными клеточными антигенами [132]. Накопление знаний о биологии рака позволит выявлять новые клеточные цели и направленно создавать мультифункциональные конструкции для точного воздействия на мишени, отвечающие за пролиферацию, адгезию, метаболизм, распространение и другие механизмы злокачественных новообразований [133]. Можно предположить, что будущий успех клинического применения антител будет в большой степени определяться разработкой новых мишеней для них по мере накопления новых знаний о механизмах и молекулярных участниках патологических процессов. ●

*Работы лаборатории С. М. Деева по инженерии антител поддержаны грантом РФФИ № 09-04-01201-а, ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы», программами Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и «Основы фундаментальных исследований нанотехнологий и наноматериалов».*



УДК 576.316.24

# Регуляция теломеразы в онкогенезе

Д. А. Скворцов<sup>1</sup>, М. П. Рубцова<sup>1</sup>, М. Э. Зверева<sup>1</sup>, Ф. Л. Киселев<sup>2</sup>, О. А. Донцова<sup>1#</sup>

<sup>1</sup> Химический факультет МГУ имени М. В. Ломоносова, 119992, Москва.

<sup>2</sup> ГУ РОНЦ имени Н. Н. Блохина РАМН, 115478, Москва.

#e-mail: dontsova@genebee.msu.su

## РЕФЕРАТ

Теломераза – сложный рибонуклеопротеид, достраивающий в клетках эукариот теломерные концы хромосом, укорачивающиеся из-за недорепликации ДНК. Коровый фермент состоит из белковой каталитической субъединицы (теломеразная обратная транскриптаза, TERT – Telomerase Reverse Transcriptase) и теломеразной РНК (TR – Telomerase RNA), небольшой определенной участок которой служит матрицей для синтеза теломерных повторов. Активность теломеразы не проявляется в соматических клетках и тканях человека за редким исключением. Активация теломеразы в раковых клетках достоверно показана в 80–90 % случаев.

Понимание того, как работает теломераза, и регулирующих ее работу механизмов может быть использовано в онкодиагностике. Сама теломераза и ее регуляторы могут быть важными мишенями антираковой терапии. На активность теломеразы влияют белки, имеющие множество функций в клетке, соответственно, их воздействие не обязательно специфично. Также встречаются случаи, когда регуляторы теломеразы действуют совместно либо несколько регуляторов объединены в каскад.

Целью данного обзора является обобщение и систематизация данных о регуляции теломеразы при онкогенезе.

**Ключевые слова:** теломераза, теломеразная обратная транскриптаза, теломеразная РНК, регуляция, рак.

**Принятые сокращения:** 5azadC – 5-аза-2'-дезоксцитидин, АВ – аденовирусы, HBV – вирус гепатита В, ВПЧ – вирус папилломы человека, ВЭБ – вирус Эпштейна-Барра, нп – нуклеотидная пара, ОВ-мотив – олигонуклеотид/олигосахарид связывающий мотив, ОТ – обратная транскрипция, ПЦР – полимеразная цепная реакция, РНКаза – рибонуклеаза, TERT – белок теломеразной обратной транскриптазы, hTERT – TERT человека, mTERT – TERT мыши, DN-hTERT – доминантно-негативный мутированный hTERT, ERβ – рецептор эстрогена β, HTLV-I – человеческий лимфотрофический вирус 1-го типа, TR – теломеразная РНК, TRAP – протокол амплификации теломерных повторов, ФГА – фитогемагглютинин, HRE – участок ответа на гипоксию, NES – сигнал транспорта из ядра.

## ВВЕДЕНИЕ

В 1961 г. Хайфлик и Мурхиад показали, что культура соматических клеток имеет ограниченный период жизни [1]. В 1973 г. Оловников предположил, что укорочение концов хромосом (теломер) определяет возможное число делений клетки [2]. Теломеры защищают геном клетки от дегградации, участвуют в мейотическом спаривании хромосом и в регуляции транскрипции генов прителомерной области [3]. В клетках, способных размножаться бесконечно (бессмертных), должен существовать механизм, компенсирующий укорочение теломер. В 1985 г. Блекберн и Грейберг открыли фермент, удлиняющий теломеры, – теломеразу [4].

Теломераза – рибонуклеопротеиновый комплекс, состоящий из абсолютно необходимых для активности компонентов: молекулы РНК – TR и теломеразной обратной транскриптазы – TERT [5]; также в состав теломеразы может входить ряд ассоциированных с ними белков. TR является матрицей для TERT при удлинении теломер с помощью теломеразы. Теломераза в клетках человека существует в виде

димера и содержит две субъединицы обратной транскриптазы и две молекулы РНК [6]. В теломеразе человека с hTERT связываются: p23/p90 – шаперон, отвечающий за сборку/конформацию комплекса; 14-3-3, обеспечивающий ядерную локализацию; TP1 с неизвестной функцией. С hTR связываются белки hGAR1, Dyskerin/NAP57, hNHP2, C1/C2, отвечающие за стабильность, созревание и локализацию РНК; La, hStau, вероятно, отвечающие за присоединение к теломерам; L22, участвующий в процессинге ядерной локализации; hNOP10, A1/UP1, TP1 с неизвестными функциями [7], TCAB1, отвечающий за локализацию hTR в тельцах Кахала и связывание с теломерами [8]. Ферментативная активность теломеразы человека в лизате ретикулоцитов кролика детектируется при добавлении hTR и hTERT [9, 10]. Заметим, что выполнение теломеразой своих функций *in vivo* не всегда совпадает с наличием теломеразной активности, измеренной *in vitro*. Например, добавление гемагглютининового эпитопа на С-конец hTERT при сохранении теломеразной активности препятствует удлинению теломер [11].

Детектируемая *in vitro* теломеразная активность появляется в лейкоцитах в G1-фазе (рис. 1) [12]. С другой стороны, *in vivo* теломеры реплицируются во время S-фазы (рис. 1) [13, 14]. В течение большей части клеточного цикла hTR накапливается в тельцах Кахаля при помощи TCAB1 [8], в S-фазе совмещаясь с теломерами в клетках. hTERT также в S-фазе клеточного цикла перемещается на теломеры [15, 16]. Это свидетельствует о существовании регуляции на уровне пространственной локализации активной теломеразы (фермента) и теломеры (субстрата). Не всегда наблюдается корреляция активности теломеразы и длины теломер. Например, при лейкемии зависимость между длиной теломер и активностью теломеразы отсутствует [17].

Активность теломеразы в зависимости от числа делений

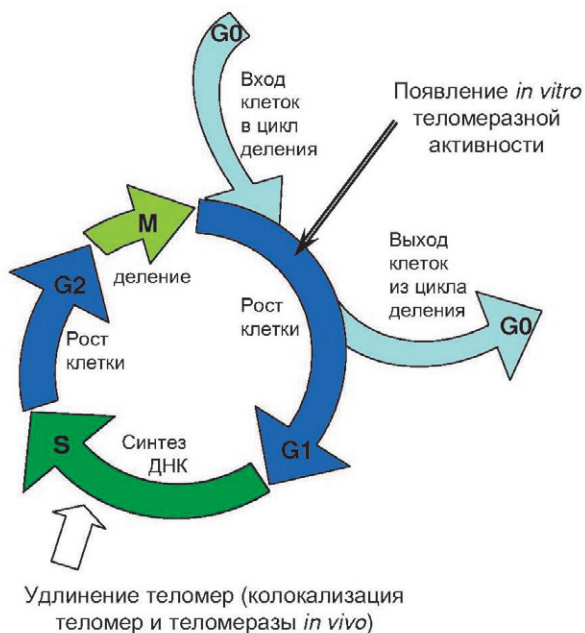


Рис. 1. Схема клеточного цикла. Появление активности теломеразы *in vitro* происходит в G1-фазе, а работает она в S-фазе

хорошо описывается двухшаговой гипотезой клеточного старения и обретения бессмертия (иммортализации) – теорией M1/M2 (рис. 2). В эмбриональных клеточных линиях теломераза активна, и длина теломер поддерживается на постоянном уровне. В стволовых клетках активность теломеразы ниже и позволяет лишь частично компенсировать укорочение теломер. В соматических клетках активность теломеразы отсутствует. Укорочение теломер приводит в момент M1 – достижение предела Хайфлика (точка А на рис. 2) – к переходу клеток в состояние сенесценса (старения), которое может быть преодолено инактивацией (удалением) pRB/p16 или p53. Клетки, преодолевшие M1, продолжают делиться и входят в состояние кризиса M2 (точка Б на рис. 2), сопровождающееся массовой клеточной смертью. Уцелевшие клетки перерождаются в раковые. Раковые клетки способны к неограниченному делению и поддержанию длины теломер (как правило, с помощью теломеразы). Если экспрессирующие hTR соматические клетки трансфицировать геном hTERT (точка В на рис. 2) до момента M2, в них, как и в раковых, происходит удлинение и стабилизация теломер [7].

Активность теломеразы не проявляется в соматических клетках и тканях человека за редким исключением. Показано ее наличие в репродуктивных тканях, а также в быстро обновляющихся тканях, например, в некоторых клетках крови, кишечном эпителии и базальном слое клеток кожи [18], при этом в соматических клетках с активной теломеразой уровень ее активности ниже, чем в раковых [19].

### ЧАСТОТА ДЕТЕКЦИИ ТЕЛОМЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ В РАЗЛИЧНЫХ ОПУХОЛЯХ

В большинстве опухолевых клеток (80–90 %) теломераза активна (табл. 1) и является основным инструментом поддержания длины теломер. Доброкачественные опухоли и другие предраковые поражения представлены как опухолями, в которых теломеразная активность проявляется почти в 100 % случаев, так и опухолями, в которых активность теломеразы не определяется [19–21]. Опухолевые клетки некоторых типов могут использовать альтернативный механизм поддержания длины теломер, основанный на рекомбинации [22]. Хотя при трансфекции геном hTERT клеток с альтернативным механизмом поддержания теломер работают оба механизма, при объединении клеточных линий с разными механизмами в гибридах присутствует теломераза, а признаки альтернативного механизма удлинения теломер пропадают [23]. Следует отметить, что сама по себе теломераза не является онкогеном. Клеточные линии, трансфицированные геном hTERT, долгое время не показывают признаков злокачественной трансформации [24, 25].

Активность теломеразы может появляться вследствие отбора клонов при критическом укорочении теломер [26] (рис. 2, точка Б). Сначала клетки начинают усиленно делиться, при этом у них укорачиваются теломеры, затем выживают те из них, у которых активируется теломераза. В этом случае теломеразная активность может быть маркером опухолевой прогрессии и отрицательного прогноза. Так, при лимфогранулематозе основное увеличение активности теломеразы происходит при переходе от первой

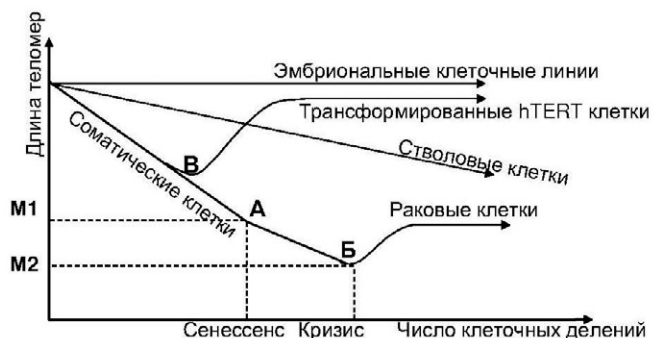


Рис. 2. Зависимость длины теломер от числа делений в различных типах клеток: эмбриональных клеточных линиях, соматических клетках, трансфицированных hTERT клетках. а – достижение клетками предела Хайфлика, б – кризис, сопровождающийся гибелью клеток и перерождением уцелевших в раковые, в – трансфекция клеток геном hTERT

Табл. 1. Частота встречаемости теломеразной активности в различных типах опухолей

Вид опухоли	Частота встречаемости теломеразной активности, %	Число исследованных образцов	[ссылка]
<b>ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫЕ ОПУХОЛИ:</b>			
Мелкоклеточный рак легкого	100	15	[21]
	90	10	[30]
Немелкоклеточный рак легкого	78	125	[21]
	83	68	[31]
	84	32	[30]
Мокрота при раке легкого	67.6	34	[30]
Рак желудка	72	85	[21]
Рак ободочной и прямой кишки	89	138	[21]
Рак поджелудочной железы	95	43	[21]
Рак печени	86	173	[21]
	79	24	[32]
Рак молочной железы	88	339	[21]
	59	44	[33]
Рак шейки матки	100	16	[21]
Рак яичников	91	23	[21]
Рак простаты	90	58	[21]
Рак мочевого пузыря	92	185	[21]
Рак почек	83	115	[21]
Рак Вильяма	100	6	[21]
	95.7	164	[34]
Ретинобластома	50	34	[21]
Нейроэпителиальные опухоли	62	107	[35]
	75	60	[21]
Глиобластома	72	47	[35]
	28	25	[36]
	26	38	[37]
	20	15	[35]
Астроцитомы II стадии	20	15	[35]
Олигодендроглиомы	100	19	[21]
	100	4	[35]
Олигодендроглиома II стадии	14	14	[37]
Анапластическая олигодендроглиома	43	7	[37]
Анапластическая астроцитомы	10	20	[21]
	40	15	[35]
	23	13	[37]
Нейробластома	94	100	[38]
Меланома	86	7	[21]
Плоскоклеточная карцинома	83	18	[21]
Базалиома	95	77	[21]
<b>ГЕМОБЛАСТОЗЫ:</b>			
Лимфома низкой злокачественности	86	14	[21]
Лимфома высокой злокачественности	100	16	[21]
Злокачественная лимфома ЦНС	83	12	[39]
Миелодиспластический синдром	67	6	[21]
Хронический миелолейкоз	71	42	[21]
Хронический миелолейкоз в фазе ускорения	100	21	[21]
Хронический лимфолейкоз ранняя фаза	14	14	[21]
Хронический лимфолейкоз поздняя фаза	57	7	[21]
Острый миелобластный лейкоз	73	64	[21]
Острый лимфобластный лейкоз	80	5	[21]
Лимфогранулематоз (лимфоидное преобладание)	63.6	33	[40]
Лимфогранулематоз (нодулярный склероз)	89.7	39	[40]
Лимфогранулематоз (смешанно-клеточный вариант)	96.1	26	[40]
Лимфогранулематоз (лимфоидное истощение)	100	7	[40]
<b>ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ:</b>			
Аденома ободочной и прямой кишки	45	44	[21]
Гепатит/цирроз печени (активность слабее, чем в случае рака печени)	29	148	[21]
	8/24	24/34	[32]
	25/45.9	80/37	[41]
Фиброаденома молочной железы	75	12	[21]
Лейомиома	0	14	[21]
Менингиома	0	25	[36]
Доброкачественное поражение лимфатических узлов	33	15	[21]
Доброкачественное поражение миндалин желез	100	23	[21]

ко второй стадии [27]. При другом варианте развития событий теломеразная активность появляется одновременно с другими ведущими к раку нарушениями метаболизма вследствие исходного клеточного поражения. В этом случае активность теломеразы появляется в самом начале заболевания и служит маркером начала онкологических процессов. Например, при раке шейки матки нет зависимости активности теломеразы от стадии рака – теломераза активна уже на первой стадии, а ее активация происходит во время предопухольных заболеваний [28]. Теломераза может быть исходно активна в исследуемом типе клеток, и эта активность лишь усиливается при переходе к раку, например, при гемобластозе [26]. Также теломераза может быть исходно активна в случае перерождения стволовой клетки [29]. В этом случае теломеразная активность будет обнаруживаться при начале роста опухоли, поскольку метод ее детекции не позволяет увидеть активность из одной клетки на фоне окружающей ткани, но уже небольшой пул теломеразоположительных клеток будет заметен.

К сожалению, в большинстве исследований можно найти информацию лишь о наличии теломеразной активности в определенном типе рака. Механизмы активации теломеразы изучают, как правило, на клеточных линиях, и редко можно сказать, какой механизм и с какой частотой встречается в исследуемом типе рака *in vivo*.

### АМПЛИФИКАЦИЯ ГЕНОВ hTR И hTERT

Ген, кодирующий hTR, представлен одной копией, находящейся на хромосоме 3 в положении 3q26.3. Этот участок хромосомы 3 часто амплифицируется, например, в раках шейки матки, легкого и плоскоклеточной карциноме головы и шеи. Число копий гена hTR возрастает в опухолевых клетках по сравнению с нормальными, и, в соответствии с этим, усиливается и экспрессия hTR в раках шейки матки и плоскоклеточной карциноме головы и шеи [42].

Ген hTERT, расположен на хромосоме 5 в положении 5q15.33, в регионе, который тоже часто амплифицируется в ряде раков [42]. Поскольку амплификация теломеразных генов происходит в процессе амплификации хромосом, содержащих эти гены, а не во время специфической амплификации локусов, можно сделать вывод о неспецифичности этого процесса. В случае плоскоклеточных карцином шейки матки активация экспрессии hTERT не связана с амплификацией гена hTERT [43]. С другой стороны, эта амплификация может происходить в результате хромосомной нестабильности и анеуплоидии, возникающих при критическом укорочении теломер.

**РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ TERT**

Транскриптов hTERT мало или они вовсе не детектируются в большинстве тканей человека, но часто наблюдаются в этих же тканях после неопластической трансформации [44].

**СТРУКТУРА ПРОМОТОРА ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПТАЗЫ ТЕЛОМЕРАЗЫ**

Промотор hTERT не содержит блоков ТАТА и СААТ, характерных для посадки РНК-полимеразы II, и является GC-богатым. Существуют разные данные о местоположении участка инициации транскрипции. Здесь и далее нумерация нуклеотидов в промоторе будет от А (точка +1 нп (нуклеотидная пара)) в триplete АТG, с которого начинается трансляция. В работе [45] с помощью метода защиты от РНКазы обнаружено несколько защищаемых участков в разных hTERT положительных клеточных линиях, что говорит о возможности наличия нескольких сайтов инициации транскрипции (в области -40-100 нп). Наиболее общим является защищенный участок, которому соответствует положение участка инициации транскрипции в положении -55 нп от начала трансляции. В работе [46], анализируя кэпированную мРНК клеточной линии HeLa, обнаружили сайт старта транскрипции в положении -77 нп. В настоящее время в большинстве работ именно это положение принимается за основное.

Сайты, отвечающие за регуляцию транскрипции hTERT, сосредоточены на участке в 2000 нуклеотидных пар до сайтов инициации трансляции и транскрипции [47, 48]. Наиболее важным для активации является участок от 250-300 нп перед АТG до нескольких десятков нп после [46]. Кроме того, GC-богатый участок промотора формирует CpG-островки рядом с АТG, указывая на возможность участия метилирования в регуляции экспрессии hTERT [7].

Активность промотора связана с расположением на нем различных участков связывания регуляторных

белков, которые не только взаимодействуют с промотором, но и являются посредниками действия других регуляторов. На рис. 3 приведена схема влияния различных эффекторов на промотор hTERT, которые дальше рассмотрены более подробно.

**МЕТИЛИРОВАНИЕ ПРОМОТОРА hTERT**

В опухолевых клетках профиль метилирования отличается от профиля нормальных клеток. Анализ промотора теломеразы выявил два CpG-островка, один из которых находится в положении -900 нп от стартового кодона АТG [49].

В случае раковых клеточных линий и тканей рака кишечника оказалось, что в них экспрессируется hTERT, и CpG-островки промотора hTERT полностью или частично метилированы [50]. При длительной обработке деметилирующим агентом 5-аза-2'-дезоксцитидином (5azadC) клеточных линий Lan-1, HeLa, Co115, в которых теломераза активна, а промотор hTERT гиперметилирован, показано снижение уровня метилирования промотора hTERT на 95 % и уменьшение уровня экспрессии мРНК hTERT. Активность теломеразы сильно падает после 2-4 пересевов клеток в присутствии 5azadC [51].

Маркеры активного хроматина и экспрессия теломеразы детектируются, когда участок промотора hTERT -73-+227 нп вокруг сайта транскрипции не метилирован [52]. В нормальных клетках гиперметилирование промотора hTERT угнетает активность теломеразы и экспрессию мРНК hTERT, и при их обработке 5azadC теломераза активируется [53]. Анализ метилирования промотора hTERT у пациентов с хроническими В-клеточными лимфоидными лейкозами показал, что при высокой теломеразной активности заметно снижен уровень метилирования [49]. Нет зависимости активности теломеразы от статуса метилирования промотора hTERT для клеточных линий остеосаркомы, образцов тканей раков яичника, шейки матки и нормальных тканей [54, 55].

Такой разброс данных говорит о том, что метилирование ДНК не является критическим фактором регулирования экспрессии теломеразы при раке. Оно происходит одновременно с другими нарушениями системы регуляции промотора hTERT. Кроме того, как метилирование, так и деметилирование могут влиять на трансрегуляторы теломеразы, а не на сам промотор.

**МЕТИЛИРОВАНИЕ ГИСТОНОВ ПРОМОТОРА hTERT**

Метилирование гистонов, проводимое метилтрансферазами и деметилазами гистонов, играет важную роль в регуляции структуры хроматина и транскрипции. Метилтрансфераза SMYD3, участвующая в онкогенезе, специфично активирует ген теломеразной обратной транскриптазы. Эта метилтрансфераза занимает свой участок связывания на промоторе hTERT и триметилирует гистон H3-K4. Подавление SMYD3 в раковых клетках упраздняет триметилирование H3-K4, ослабляет связывание с промотором ацетилированию гистона H3 в промоторе hTERT, что приводит к сокращению количества мРНК hTERT и снижению теломеразной активности [56].

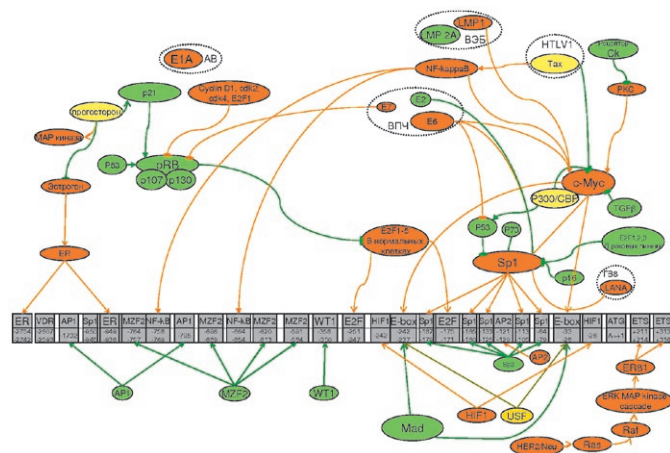


Рис. 3. Схема влияния трансрегуляторов промотора hTERT. Зеленым обозначены ингибиторы промотора hTERT, оранжевым – активаторы, желтым – эффекторы двойного действия. Стрелкой + обозначена активация следующего участника каскада, стрелкой - ингибирование следующего участника каскада, без стрелки – совместное действие



### АЦЕТИЛИРОВАНИЕ И ДЕАЦЕТИЛИРОВАНИЕ ГИСТОНОВ ПРОМОТОРА hTERT

Ацетилтрансферазы GCN5 и Tip60 ацетилируют гистоны H3 и H4, что приводит к активации транскрипции hTERT. Эти же ацетилтрансферазы ацетилируют Мус, что приводит к уменьшению его деградации [57], и другие белки, участвующие в транскрипции генов, что может опосредованно регулировать промотор hTERT. Ацетилтрансфераза p300 и сопутствующий СВР – транскрипционные коактиваторы, которые взаимодействуют с большим количеством сиквенс-специфических транскрипционных факторов, в т.ч. являются коактиваторами онкосупрессора p53 [58]. p300 является коактиватором транскрипции hTERT, который приносится на промотор белком с-Мус. Хотя p300 и СВР могут стабилизировать Мус независимо от ацетилирования, проводимое p300 ацетилирование при этом снижает уровень связывания Мус с промотором. Таким образом, p300 может участвовать и в активации, и в ингибировании промотора hTERT. Комплекс Мус/Мах по-разному ацетируется p300 и GCN5 и не ацетируется Tip60 *in vitro*, что говорит о различных механизмах действия этих ацетилтрансфераз [59].

Деацетилирование гистонов приводит к снижению экспрессии hTERT [60, 61]. Суперэкспрессия деацетилаз гистонов (HDAC1) приводит к подавлению активности промотора hTERT. HDAC1 связывается с промотором теломеразы, угнетает теломеразную активность и взаимодействует с Sp1 [62]. Деацетилазы гистонов могут взаимодействовать с промотором hTERT с помощью белка Mad1, связывающегося с E-блоками [60, 62, 63]. Ингибирование деацетилирования гистонов Трихостатином А (TSA) приводит к активации экспрессии hTERT, этот эффект зависит от Sp1, но не от с-Мус. При суперэкспрессии Sp1 эффект TSA возрастает, а при мутациях в участках связывания Sp1 (но не с-Мус) аннулируется [63]. Ингибирование деацетилирования гистонов приводит к увеличению экспрессии и активности теломеразы в нормальных, но не в раковых клетках (клеточные линии рака легкого) с уже активной теломеразой [63, 64]. Можно предположить, что в случае рака деацетилирование гистонов уже выключено.

### КАСКАД МАРК

Сигнальный каскад митоген-активируемой протеинкиназы МАРК, эффектора внеклеточных сигналов роста и сигналов стресса, может регулировать транскрипционную активность многих промоторов за счет прямого фосфорилирования Sp1 или по иным механизмам. Сигнальный путь МАРК важен для регуляции транскрипции hTERT через ряд эффекторов, связывающихся с участками в его основном промоторе, включая транскрипционные факторы с-Мус, AP-1 и Ets [42]. Подавление каскада МАРК приводит к ослаблению фосфорилирования рецептора эстрогена  $\beta$  (ER $\beta$ ) и уменьшению связывания ER $\beta$  с промотором hTERT с соответствующим снижением уровня экспрессии hTERT [65].

### ОНКОГЕН МУС И ЕГО АНТИПОД МАД

В положениях -242 и -34 нп гена hTERT находятся E-блоки, с которыми взаимодействует онкопротеин с-Мус, являющийся одним из основных активаторов транскрипции

hTERT [48, 66]. Этот белок является также транскрипционным активатором целого ряда промоторов других генов и ингибитором транскрипции генов, участвующих в остановке роста клеток [67].

Наблюдение воздействия антисенс-олигонуклеотидов с-Мус, подавляющих его экспрессию, на 3 клеточные линии лейкемии выявило падение в этом случае и теломеразной активности [68]. с-Мус индуцирует транскрипцию hTERT и теломеразную активность в нормальных клетках эпителия молочных желез и первичных фибробластах человека [69]. Высокий уровень с-Мус приводит к активации промотора hTERT, а при удалении E-блоков этот эффект теряется [66, 67, 70]. Нарушение связывания с-Мус имеет разный эффект в различных клеточных линиях. Так, введение мутаций в E-блок, находящийся в положении -242 нп, в клетках линий С33А и ME180 приводит к падению активности промотора hTERT на 70 %, а в клетках линии SiHa такие мутации имеют незначительный эффект. При введении мутаций в E-блок, находящийся в положении -34 нп, происходит снижение активности промотора hTERT на 60 % в клетках ME180, тогда как в клетках С33А и SiHa активность промотора hTERT меняется незначительно [71]. Индуцируемая с-Мус активация промотора hTERT происходит быстро и независимо от клеточной пролиферации и белкового синтеза [67, 70]. Гетеродимеры с-Мус/Мах взаимодействуют непосредственно с промотором hTERT [61, 66].

Возможно, что другим активатором теломеразы является белок N-Мус. Амплификация этого гена в нейробластоме наблюдается одновременно с активацией промотора hTERT [44]. Показано связывание N-Мус с промотором hTERT [72].

Белок Mad является антиподом с-Мус и ослабляет активность промотора hTERT, связываясь с E-блоками в виде гетеродимера Mad/Мах. Угнетение промотора hTERT белком Mad требует наличия активных деацетилаз гистонов. При этом ингибирование деацетилаз гистонов с помощью TSA не зависит от наличия E-блоков в промоторе hTERT [60].

### ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ SP1 И SP3

Белок Sp1 регулирует ряд специфических промоторов, инициирующих транскрипцию у позвоночных РНК-полимеразой II. Sp1 связывается с последовательностью GGGCGGGC и сходными с ней последовательностями, называемыми GC-боксами. Он регулирует промоторы как hTERT, так и hTR.

В промоторе hTERT находится серия участков связывания Sp1 необходимых для активности промотора [46-48, 71, 73]. Подобные кластеры часто встречаются и в других, не содержащих ТАТА-боксов, промоторах и необходимы для их полной активации [74]. Известно 5 участков связывания Sp1 в основном промоторе между E-блоками [46]. 2 участка связывания Sp1 совпадают у человека и мыши [67]. В регуляции, судя по активным участкам промотора, наверняка принимают участие сайты Sp1, находящиеся между E-блоками, внесение мутаций в которые приводит к падению активности промотора в различной степени, в зависимости от мутируемого сайта и клеточной линии [71]. В случае выключения всех 5 участков связывания про-

исходит снижение активности промотора hTERT на 90 %, т.е. Sp1 абсолютно необходим для его активности [60, 71]. Интересно, что если при наличии участков связывания Sp1 введение с-Мус активирует промотор hTERT, то когда их нет, активация промотора hTERT белком с-Мус незначительна [71]. Вероятно, в регуляции участвуют два мало исследованных участка связывания Sp1, находящиеся в районе -320-350 нп от сайта трансляции [47, 48] и, возможно, два предполагаемых участка в районе -800-1000 нп [47]. Маловероятно, чтобы расположенные далее от сайта начала транскрипции участки связывания Sp1 [47] принимали участие в регуляции транскрипции hTERT.

Другим повсеместно экспрессируемым белком семейства Sp является белок Sp3, который часто выступает конкурентным ингибитором Sp1 [75]. Изменение соотношения этих двух белков в пользу Sp3 приводит к ингибированию транскрипции hTERT [76].

И Sp1 и Sp3 также требуются для репрессии промотора hTERT деацетилазами гистонов, вероятно, связывая их с промотором hTERT [77]. Кроме вышеизложенного, Sp1 является посредником целого ряда как активаторов, так и ингибиторов транскрипции hTERT (рис. 3).

**ЯДЕРНЫЙ ФАКТОР NF-kB**

NF-kB контролирует экспрессию и функции ряда генов, участвующих в развитии рака [78], в т.ч. с-Мус, являющегося трансактиватором теломеразы. Когда белок Tax человеческого лимфотрофического вируса 1-го типа (HTLV-I, Human T-lymphotropic virus I) активирует NF-kB, происходит последовательное повышение активности промоторов с-Мус и hTERT [79]. Иммунопреципитация хроматина показала усиление связывания с-Мус и Sp1 с промотором hTERT при его активации NF-kB [80].

Экспрессия генов NF-kB и hTERT происходит одновременно и увеличивается на ранних стадиях появления рака желудка [81]. Одновременный синтез с hTERT и наличие потенциальных сайтов связывания NF-kB в промоторе hTERT (участки -758-749 нп, -664-654 нп) позволяют предположить, что NF-kB участвует в активации теломеразы [82]. Активация промотора mTERT в результате связывания с ним NF-kB показана у мышей [82].

NF-kB (p65 субъединица) может взаимодействовать с деацетилазами гистонов (HDAC1), за счет этого участвуя в отрицательной регуляции экспрессии генов [83]. Деацетилазы гистонов ингибируют промотор hTERT, связываясь с ним с помощью Sp1. NF-kB в случае его связывания с промотором может использоваться для связывания HDAC1.

**ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ AP1 И AP2**

Транскрипционный фактор AP1 (activator protein 1) участвует в процессах клеточной пролиферации, дифференцировки, канцерогенеза и апоптоза и экспрессируется как в раковых, так и в нормальных клетках. Он является гетеродимером Jun (с-Jun, JunB или JunD) и Fos (с-Fos, FosB, Fra-1 или Fra2) [84].

Суперэкспрессия AP-1 приводит к подавлению транскрипции hTERT в клеточной линии HeLa. Комбинация с-Fos и с-Jun или с-Fos и JunD уменьшает активность промотора hTERT на 80 % в опытах с кратковременной экспрессией. Участок промотора hTERT между нуклео-

тидами -2077 и -455 нп принимает в этом участие. JunD и с-Jun связываются с обоими предполагаемыми участками связывания AP-1 в положениях -1732 и -795 нп. Внешение мутаций в участки связывания AP-1 на промоторе hTERT нивелирует вызываемое AP-1 ингибирование [84]. При амелобластоме обнаружена корреляция между экспрессией с-Fos, одной из субъединиц AP-1, и экспрессией мРНК hTERT [85].

Промотор hTERT также содержит потенциальный участок связывания AP-2 [48, 86]. AP-2 связывается с участком -121-129 промотора hTERT. В клетках линии рабдомиосаркомы мутация в участке связывания AP-2 приводит к уменьшению активности промотора. При этом суперэкспрессия AP-2 не приводит к увеличению активности промотора hTERT [86].

**ОНКОСУПРЕССОРЫ P53 И P73**

Белок p53 регулирует множество генов, участвующих в контроле клеточного цикла и онкогенезе (p21, MDM-2, Вах, с-Fos/Jun, pRB, 14-3-3σ, Bcl2 и ряд других) [87-89]. p53 противодействует онкогенезу, включая механизмы ареста клеточного цикла и апоптоза в ответ на различные поражения клетки [87]. Этот белок неактивен более чем в половине типов человеческих опухолей [90]. Восстановление функционального p53 в раке шейки матки, лимфоме Беркитта, раках молочной и поджелудочной желез приводит к ингибированию теломеразной активности за счет подавления экспрессии hTERT [91-94]. Этот эффект проявляется в течение нескольких часов после индукции p53, до того как происходит нарушение клеточного цикла и начинается апоптоз.

Мутации в доменах p53, ответственных за связывание деацетилаз гистонов и корепрессора Sin3A, не влияют

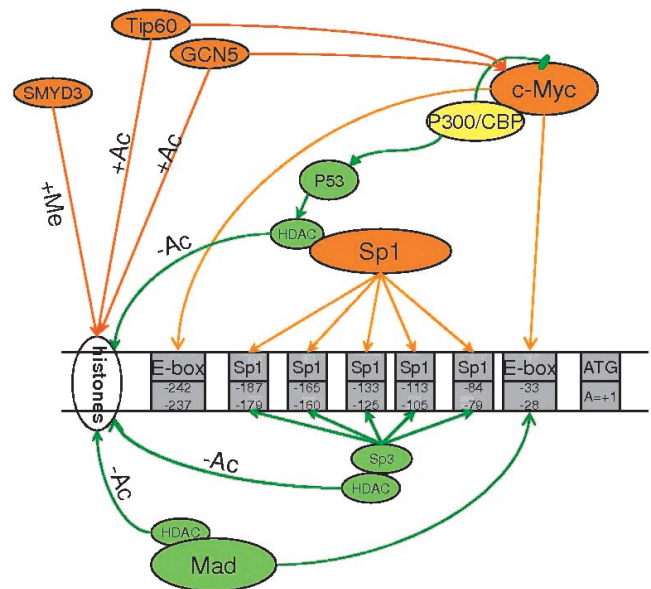


Рис. 4. Метилирование (+Me), ацетилирование (+Ac) и деацетилирование (-Ac) гистонов промотора hTERT. Зеленым обозначены ингибиторы промотора hTERT, оранжевым – активаторы, желтым – эффекторы двойного действия. Стрелкой → обозначена активация следующего участника каскада, стрелкой – ингибирование следующего участника каскада

на угнетение hTERT, хотя деацетилазы участвуют в ингибировании транскрипции hTERT белком p53. Мутации p53 в домене связывания с ДНК, домене олигомеризации или домене активации транскрипции приводит к деактивации p53 по отношению к теломеразе. При этом p53 не связывается *in vivo* с промотором hTERT, т.е. его действие на промотор не прямое. p53 может использоваться в качестве посредников белки p21, E2F и белки группы pRB [95].

Для проявления ингибирования p53 необходим Sp1 [92, 94]. Мутации в участках связывания Sp1 ликвидируют подавление активности промотора hTERT с помощью p53 [92]. Эксперименты в клетках *Drosophila Schneider SL2* показали, что активация промотора hTERT, зависящая от эктопической экспрессии Sp1, аннулируется p53 дикого типа. p53 взаимодействует с Sp1 и предотвращает его связывание с промотором hTERT *in vitro* [94]. p53, возможно, использует в качестве посредника белок p21 [95], хотя в аналогичных более ранних экспериментах обнаружено, что p21 не является посредником в действии p53 на теломеразу [94].

Белок p73 проявляет онкосупрессорные функции, подобно p53. Изучение не вырабатывающих p53 клеток показало, что суперэкспрессия C-концевых изоформ p73 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) приводит к уменьшению активности промотора hTERT. Угнетение экспрессии hTERT происходит при посредничестве эндогенного p73 после активации E2F1 в клетках. Мутации в участках связывания Sp1 в основной части промотора hTERT нивелируют репрессию промотора hTERT с помощью p73, свидетельствуя об участии Sp1 в этом процессе в качестве посредника. Кроме того, p73 связывается с Sp1, что подтверждает участие Sp1 в p73-зависимом угнетении экспрессии hTERT [96].

### БЕЛКИ pRB, E2F, P21 И P16

Белки E2F могут как угнетать, так и активировать онкотрансформацию на модельных системах [97]. Суперэкспрессия E2F-3 коррелирует с худшим прогнозом в раках простаты, яичников, немелкоклеточного рака легкого, высокого уровня E2F-1 – в раках легкого, молочной и поджелудочной желез. При этом пониженная экспрессия E2F-1 наблюдается при более агрессивном течении болезни в раках прямой кишки и мочевого пузыря. Также E2F-1, E2F-2 и E2F-3 регулируются белком pRB, тогда как E2F-4 и E2F-5 в основном регулируются белками p107 и p130. E2F-1, E2F-2 и E2F-3 могут связывать Sp1, а ни E2F-4, ни E2F-5 с ним не взаимодействуют [98].

Белок E2F-1 связывается с промотором теломеразы в двух специфических участках (в районах -251 и -175 нп). Кроме того, на участке -67-61 нп присутствует неклассический участок связывания E2F-1 [99]. E2F-1 снижает экспрессию мРНК hTERT и активность теломеразы в клетках линий плоскоклеточной карциномы [99, 100]. Эктопическая экспрессия E2F-1, E2F-2 и E2F-3 уменьшает активность промотора теломеразной обратной транскриптазы в клетках линий HeLa, U2OS, 273 при посредничестве Sp1, а E2F-4 и E2F-5 не угнетают теломеразу. В то же время в нетрансформированных hTERT клетках активация эндогенной теломеразы наблюдается при воздействии E2F-1,2,3,4,5 факторов [98].

Иные результаты получены в работе [101] на клетках линии плоскоклеточной карциномы. Обнаружено, что ак-

тивность промотора hTERT и активность теломеразы снижает только суперэкспрессия pRB, а суперэкспрессия E2F-1 восстанавливает активность промотора hTERT. При исследовании глиобластомы обнаружена корреляция в экспрессии E2F1 и hTERT, пациенты с низким уровнем экспрессии E2F-1 имели гораздо более благоприятный прогноз [102]. Эктопическая экспрессия экзогенного E2F-1 увеличивает активность промотора hTERT в клеточных линиях Saos-2, HeLa и U-251 MG [102]. Разброс данных может быть связан с гетерогенностью клеточных линий (та же линия HeLa, десятилетиями культивируемая в различных лабораториях, может значительно различаться в разных источниках). Второй причиной может быть не только критичность для активации или ингибирования промотора hTERT белками E2F их наличия, но и их посттрансляционные модификации и модификации pRB, участвующего в этом каскаде.

E2F-1, вероятно, является одним из посредников p53. Мутации неканонического участка связывания E2F-1 и суперэкспрессия мутанта E2F-1, способного связываться с ДНК, но с отсутствующими доменами трансаактивации и связывания pRB, приводят к полному нивелированию влияния p53. Такой же эффект при угнетении белков pRB, p107 и p130 [95].

Суперэкспрессия p21 и pRB полностью подавляет экспрессию hTERT и останавливает клеточный цикл в клетках линии U-251 MG [102]. Появление в клетках белка p21, ингибитора циклин-зависимых киназ, приводит к накоплению гиперфосфорилированной активной формы pRB, p130, p107. Эти белки связываются с белками семейства E2F, переводя их из активаторов транскрипции в репрессоры [103]. Восстановление экспрессии pRB в pRB- и p53-негативных раковых клетках приводит к угнетению теломеразной активности и остановке клеточного цикла [104]. Для восстановления подавленной pRB теломеразной активности достаточно суперэкспрессии циклин-зависимых киназ cdk2 или cdk4, или циклина D1, или E2F-1. Для функционирования pRB как ингибитора промотора hTERT критично фосфорилирование pRB [101]. Ингибирующее действие pRB может объясняться связыванием с E2F-1 и дальнейшим связыванием с промотором hTERT [101], в т.ч. с привнесением дополнительных ингибиторов, например, деацетилаз гистонов. Также pRB может нарушать связывание E2F-1 с промотором hTERT. pRB и E2F-1 могут регулировать экспрессию и независимо друг от друга.

Белок-онкосупрессор p16 участвует в регуляции системы pRB/E2F. Его экспрессия заметно снижает уровень теломеразной активности в клеточных линиях глиомы. p16 ингибирует связывание Sp1 с его участками связывания в промоторе [105]. В работе [100] p16 ингибирует теломеразу в клетках линий плоскоклеточного рака головы и шеи незначительно, а в работе [101] активность теломеразы в клетках линии SSC25, трансфицированных экспрессирующим p16 вектором, пропадает практически полностью.

### Bcl2

Bcl2 – один из факторов апоптоза [106]. Суперэкспрессия Bcl2 в человеческих раковых клеточных линиях с низким эндогенным уровнем экспрессии этого белка сопровождается

ся возрастанием уровня теломеразной активности. При выключении экспрессии Bcl2 и ее последующей активации в линии STL-2 активность теломеразы, соответственно, обратимо понижается и повышается [107]. При исследовании серии образцов рака молочной железы не обнаружено корреляции между экспрессией Bcl2 и теломеразной активностью [108]. Также при подавлении экспрессии Bcl2 в клеточной линии лейкемии HL-60 не наблюдали изменений в экспрессии мРНК hTERT [109].

Вероятно, регуляция экспрессии hTERT белком Bcl2 не используется или используется редко при развитии природных онкогенных процессов, а найденная активация экспрессии hTERT белком Bcl2 является не прямой. Другое объяснение – этот процесс тканеспецифичен.

### ОНКОСУПРЕССОР WT1

В подавлении теломеразной активности участвует онко-супрессор WT1 [110]. В промоторе hTERT в положении 352 нп находится участок связывания WT1, мутации которого могут увеличивать активность промотора hTERT (увеличивают в клеточной линии 293, но не в клеточной линии HeLa). Суперэкспрессия WT1 подавляет экспрессию мРНК hTERT и теломеразную активность в клетках 293 [110]. Поскольку ген WT1 экспрессируется в определенных типах клеток при дифференцировке (почки, половые железы, селезенка) [111], роль WT1 в подавлении теломеразы, вероятно, тканеспецифична.

### МИЕЛОИДНЫЙ КЛЕТОЧНО-СПЕЦИФИЧНЫЙ БЕЛОК MZF-2

В промоторе hTERT находится 4 участка вероятного связывания транскрипционного фактора MZF-2 в положениях -687, -619, -543 и -514. Они отвечают за угнетение активности промотора hTERT, и MZF-2 специфически связывается с этими участками. Суперэкспрессия MZF-2 подавляет активность промотора hTERT [112].

MZF-2 экспрессируется в раковых теломераза-положительных клеточных линиях, так что, скорее всего, он играет не основную роль в ингибировании теломеразы [112].

### РЕГУЛЯТОРНЫЕ БЕЛКИ ГРУППЫ USF

Промотор hTERT содержит E-блоки, с которыми могут связываться не только димеры Мус/Мах и Mad/Мах, но и регуляторные факторы USF.

В модельной системе с использованием репортерной конструкции экспрессия USF1 или USF2 ингибирует активность промотора. Эти белки не взаимодействуют с с-Мус или Mad и не влияют на их количество в клетке, а связываются напрямую с E-блоками в промоторе hTERT. Анализ клинических препаратов нормальных и раковых образцов ротовой полости показал, что уровни экспрессии USF1 и USF2 ниже в раковых образцах, а экспрессия hTERT и теломеразная активность в них повышены [113].

По другим данным, USF1 и USF2 в виде гетеродимера взаимодействуют с обоими участками связывания в промоторе hTERT и не влияют или подавляют транскрипцию hTERT в hTERT-негативных соматических клетках. В клетках, экспрессирующих hTERT, эти белки активируют транскрипцию, участвуя в появлении и поддержании клеточного бессмертия [114].

### ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ ETS

Белки ETS – это семейство транскрипционных факторов, в состав которых входит консервативный ДНК-связывающий домен, специфически взаимодействующий с последовательностями GGA(A/T).

МАР-киназы могут фосфорилировать белки ETS1 и ETS2 после активации фактором роста эпидермиса (EGF) и его гомологом HER2/Neu. Фосфорилированная форма ETS активна в транскрипции. Культивирование раковых клеток A-431, ME180 и MCF-7 с EGF приводит к усилению промотора hTERT. Влияние EGF нивелируется при добавлении ингибитора МАР-киназ или удалении двух предполагаемых смежных участков связывания факторов ETS с промотором в районе от -22 до -14 нп. EGF может приводить к фосфорилированию с-Мус, в результате чего последний активирует транскрипцию, но мутации участков связывания с-Мус в промоторе hTERT не влияют на способность EGF активировать транскрипцию [115]. ETS взаимодействует с промотором hTERT ДНК в положении -36 нп, активируя, а в -293 нп – ингибируя экспрессию hTERT, образуя комплекс Ets-Id2-ДНК (Id – семейство белков-регуляторов клеточного роста и ингибиторов дифференцировки) [116]. Суперэкспрессия ETS1 и ETS2 приводит к уменьшению, а суперэкспрессия Id2 – к возрастанию теломеразной активности в клетках линии K562 [117].

Онкопротеин HER2/Neu активирует транскрипцию hTERT, используя в качестве посредника транскрипционный фактор ER81 из семейства ETS. Экспрессия только ER81 или HER2/Neu в клеточной линии VJ не стимулирует экспрессию мРНК hTERT. Одновременная экспрессия этих генов индуцирует транскрипцию мРНК hTERT и активность теломеразы. В модельной системе экспрессия ER81 и HER2/Neu увеличивает активность промотора в 3 и 9 раз соответственно, а их совместная экспрессия – в 37 раз (в клеточной линии 293T). Найдено 5 возможных участков связывания, и для двух из них (в положениях +211–+214 нп и +313–+316 нп) доказана возможность связывания с ER81. Мутации только этих двух участков приводят к кооперативному уменьшению активации промотора hTERT с помощью ER81 и HER2/Neu [118]. ERK MAP киназы являются посредниками между HER2/Neu и ER81. Также показано, что Ras и Raf, являющиеся регуляторами ERK MAP киназ, стимулируют транскрипцию hTERT [118].

Два других белка группы ETS того же подсемейства, что и ER81 – PEA3 и ERM – также синергично с HER2/Neu активируют промотор hTERT, хотя и в меньшей степени, чем ER81. Напротив, 4 транскрипционных фактора группы ETS, принадлежащие к другим подсемействам (Elk1, Sap1a, Elf1 и ER71), практически не активируют промотор hTERT [118].

### СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ РЕЦЕПТОРА С $\kappa$

Нарушение сигнального пути специфичного к холестерину рецептора С $\kappa$  обнаружено у больных лейкемией, в клеточных линиях лейкемии и в раках центральной нервной системы.

Активированный рецептор С $\kappa$  понижает экспрессию мРНК hTERT, ингибируя протеинкиназу С. Протеинкиназа С активирует транскрипцию PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferated receptor  $\gamma$ ), который ингибирует экспрессию с-Мус

и hTERT, снижая активность теломеразы. Также PPAR $\gamma$  может взаимодействовать с транскрипционным фактором Sp1, являющимся активатором транскрипции hTERT. Кроме того, PPAR $\gamma$  является антагонистом NF- $\kappa$ B, также являющегося активатором транскрипции hTERT [119].

### СТЕРОИДНЫЕ ГОРМОНЫ

Во многих случаях вероятность онкогенеза повышается в результате нарушений регуляции экспрессии генов с участием гормонов. Ряд гормонов, участвующих в онкогенезе, может влиять на экспрессию hTERT.

### ЭСТРОГЕН

Эстроген (17 $\beta$ -эстрадиол) активирует транскрипцию hTERT в гормон-чувствительных тканях. При обработке клеток рака молочной железы или нормальных клеток эпителия яичников эстрогеном уже через несколько часов в них увеличивается уровень мРНК hTERT и активность теломеразы [120, 121]. Анализ промотора hTERT выявил 2 участка связывания рецепторов эстрогена [122]. Участок связывания рецептора эстрогена в положении 2754 нп под действием гормона усиливает активность промотора в 5 раз. При удалении этого участка активация промотора hTERT эстрогеном уменьшается на 70 %. Второй участок, в положении 949 нп, возможно, работает в кооперации с Sp1 сайтом, который примыкает к нему [123]. С помощью футпринтинга показана защита участка -949 нп в присутствии эстрогена. Мутации этого участка сильно снижают активацию промотора hTERT эстрогеном в репортерной конструкции [121]. В другой работе найдено связывание рецептора эстрогена только с участком -2754 нп, но не с -949 нп и обнаружено, что удаление участка -949 нп из промотора hTERT не влияет на активность промотора [120]. С промотором hTERT связываются рецепторы эстрогена  $\alpha$  и  $\beta$ . Низкая теломеразная активность в раке молочной железы коррелирует с отсутствием рецептора эстрогена  $\beta$  [33]. Активация промотора hTERT в клеточной линии NIH $_3$ T $_3$  зависит от наличия  $\alpha$  рецептора эстрогена, но не  $\beta$  [121].

При регуляции эстрогеном реализуется схема многоуровневой активации теломеразы. Эстроген активирует теломеразу не только как непосредственный регулятор, но и за счет индукции другого активатора промотора hTERT – c-Myc [120].

Эстроген также активирует экспрессию hTERT через каскад PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B. Эстроген также индуцирует фосфорилирование hTERT, связывание белков 14-3-3 и NF- $\kappa$ B с hTERT и накопление hTERT в ядре при посредничестве Akt-киназы [124].

### АНДРОГЕНЫ

Нормальные ткани простаты и клеточные линии эпителия, как правило, не обладают теломеразной активностью в присутствии андрогенов, а их отсутствие вызывает активацию теломеразы в нормальных тканях простаты у крыс и не дает заметных изменений активности теломеразы в тканях сердца, почек, печени, легких [125]. В то же время большинство раков простаты имеют явно выраженную теломеразную активность при нормальном уровне андрогенов. Теломеразная активность в клеточных линиях рака простаты угнетается, когда андрогены отсутствуют [126].

Окрашивание антителами показало значительное угнетение экспрессии теломеразы в серии клинических образцов рака простаты без андрогенов [127].

В клеточных линиях раков молочной железы и матки прогестерон увеличивает количество мРНК теломеразной обратной транскриптазы уже через 3 ч после начала инкубации. Через 12 ч ее количество достигает пика и начинает уменьшаться, а через 48 ч прогестерон противодействует эстрогену и ингибирует эстроген-индуцированную экспрессию мРНК hTERT. Активирующий эффект прогестерона осуществляется через каскад MAP киназы, а ингибирование при участии p21 [128]. Комбинация эстрогена и прогестерона (моделирование понижения риска рака молочной железы при беременности) вызывает некоторое угнетение активности теломеразы и увеличение экспрессии ее ингибиторов p53 и p21 в клеточной линии эпителия молочной железы 76N TERT [129].

При росте нормальных и андроген-независимых клеточных линий рака простаты в присутствии дигидротестостерона нет изменения теломеразной активности. В случае клеток андроген-зависимой раковой клеточной линии простаты LNCaP отсутствие андрогена в среде снижает теломеразную активность. Дигидротестостерон активирует теломеразную активность в G1-фазе клеточного цикла. В то же время не происходит усиление активности промотора в опытах с репортерными конструкциями [130, 131]. Действие андрогена – не прямое, что подтверждается отсутствием элементов ответа на андроген в промоторе hTERT [126].

### ВИРУСНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ hTERT

#### ВИРУС ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА

Вирусы папилломы человека (ВПЧ) делят на 3 группы (неонкогенные, низкого и высокого риска) по вероятности неопластической трансформации зараженных клеток. Белки E6 и E7 ВПЧ группы высокого риска участвуют в онкогенезе, инактивируя раковые супрессоры p53 (E6 совместно с E6AP убиквитин белковой лигазой), pRB и ассоциированные с pRB белки p130 и p107 (E7) и еще ряд белков [132].

При трансфекции теломеразы-негативных клеток (первичных кератиноцитов) генами E6 и E7 теломеразу активирует только E6, но не E7 [133, 134]. В случае трансфекции клеток обоими генами (E6 + E7) данные противоречивы: активность теломеразы может быть как при трансфекции только геном E6 [134], несколько ниже [133] или несколько выше [73]. В клеточной линии рака шейки матки C33A (с активной теломеразой, но без ВПЧ) экспрессия E6 активирует экспрессию hTERT в 3 раза, E7 в 1.5 раза [73]. В линии клеток эпителия молочной железы E6 активирует теломеразу практически сразу, а E7 ускоряет процесс появления в популяции теломеразной активности постепенно (через 20-25 пересевов при экспрессии E7 обнаруживается высокая активность теломеразы) [135]. В целом, E6 является прямым активатором теломеразы, а возможная активация теломеразы белком E7 – опосредованный и слабый эффект.

E6 активирует транскрипцию теломеразы, используя участок промотора от -260 нп до сайта инициации трансляции (-15-266 нп [134], -258 нп [73]), на котором расположены

2 участка связывания с-Мус, при удалении каждого из которых происходит падение активности на 60 % [134]. Е6 соосаждается с с-Мус при иммунопреципитации [136]. Изменение уровня экспрессии с-Мус при трансфекции клеток геном Е6 не обнаружено. При суперэкспрессии гена, кодирующего Мах (белок-антагонист, конкурирующий с Мус), происходит подавление экспрессии hTERT, вызванное Е6 [134]. По данным других авторов, введение мутаций в оба участка связывания с-Мус дает лишь незначительное уменьшение активности промотора. В то же время мутации в сайтах связывания Sp1 приводят к снижению индуцируемой Е6 активности промотора до 50 %. Мутации же участков связывания с-Мус и Sp1 одновременно приводят к практически полному исчезновению активации транскрипции теломеразы белком Е6 [73].

В кератиноцитах и клетках эпителия молочной железы сильным активирующим теломеразу действием обладает Е6 у ВПЧ группы высокого онкологического риска (ВПЧ 16, ВПЧ 18, ВПЧ 31 и ВПЧ 54), а в случае ВПЧ группы низкого риска (ВПЧ 11, ВПЧ 6) активация транскрипции hTERT невелика [73]. Белок Е6 вирусов папилломы только группы высокого риска связывается с минимальным промотором hTERT (-300+1 нп) [136]. Активация теломеразы белком Е6 является специфичной к типу клеток. Трансфекция клеток геном Е6, приводящая в случае клеток эпителия шейки матки к активации теломеразы, при использовании фибробластов крайней плоти [137] или клеток IMR90 [69] не дает аналогичного эффекта.

Белок Е2 ВПЧ способен угнетать промотор hTERT. Этот белок может связываться с промотором hTERT. Для ингибирования промотора важно его взаимодействие с Sp1, участки связывания которого находятся между Е-блоками. Е2 способен ингибировать рост ВПЧ-инфицированных клеток и приводить к апоптозу клетки HeLa [138].

### **ВИРУС ГЕПАТИТА В**

Белок X вируса гепатита В (HBV) – транс-активатор, мишенями которого являются гены с-Мус, AP1, AP2, NF-kB [19], в свою очередь являющиеся активаторами теломеразы.

Частота встречаемости теломеразной активности увеличивается при переходе от нормальной ткани к раку: в 79 % раков, 24 % цирроза и 8 % хронического гепатита [32]; в 85.2 % раков, 45.9 % цирроза печени, 25 % хронического гепатита и 15.7 % нормальных тканей [41].

При трансфекции клеточных линий геном белка X HBV происходит увеличение количества мРНК hTERT (клеточные линии гепатокарциномы и холангиокарциномы) [139]. С помощью Вестерн-блот-анализа обнаружено, что количество теломеразной обратной транскриптазы возрастает в клеточной линии гепатомы при суперэкспрессии белка X HBV [140].

Одновременно с hTERT обнаружено небольшое возрастание количества с-Мус при суперэкспрессии белка X в клеточной линии гепатомы [140]. Поскольку с-Мус активируется белком X и активирует экспрессию hTERT, возможно, он является одним из посредников в активации теломеразы при заражении HBV. С другой стороны, связи экспрессии мРНК hTERT с уровнем с-Мус не обнаружено в клинических образцах рака печени методом гибридизации *in situ*.

В участках связывания с-Мус с промотором hTERT в клинических образцах гепатоклеточной карциномы встречаются мутации [141].

Участки возможного связывания ядерных гепатоцеллюлярных факторов HNF-3b и HNF-5 найдены в промоторах TERT как у человека, так и у мыши. Хотя они консервативны, их функциональная значимость остается неопределенной [67].

### **ГЕРПЕСВИРУСЫ (ВИРУСЫ ЭПШТЕЙНА-БАРР, САРКОМЫ КАПОШИ)**

Оба герпесвируса, являющиеся онкогенными для человека, могут участвовать в регуляции транскрипции hTERT.

Вирус Эпштейна-Барра (ВЭБ) является возбудителем инфекционного мононуклеоза и связан с образованием раков, например, с лимфомой Беркитта [19, 142]. Латентный мембранный белок 1 (LMP1) ВЭБ индуцирует специфическое связывание hTERT с р65 субъединицей NF-kB и перенос обоих белков из цитоплазмы в ядро [143]. Другой механизм активации экспрессии hTERT белком LMP1 осуществляется путем трансактивации им с-Мус [144]. Латентный мембранный белок ВЭБ LMP 2A угнетает транскрипционную активность гена hTERT [145].

Герпесвирус типа 8 идентифицирован как возбудитель множественной пигментированной саркомы кожи (Капоши) [19]. Ядерный антиген LANA этого вируса, является активатором транскрипции hTERT. Этот белок может связываться с Sp1, и активация промотора теломеразы, вероятно, осуществляется в результате этого взаимодействия [146].

### **T-ЛИМФОТРОПНЫЕ ВИРУСЫ**

T-лимфотропные вирусы первого и второго типов (HTLV-I и HTLV-II) активируют теломеразу [80, 147].

У всех взрослых пациентов с острой или хронической формой T-клеточной лейкемии обнаружена высокая активность теломеразы, в то время как у бессимптомных носителей HTLV-I активность теломеразы определяется лишь в 29 % случаев. У двух из семи пациентов с активной теломеразой произошел переход в острую форму в течение месяца [148]. Однако отсутствие достаточного количества данных (было проанализировано всего 24 пациента) не позволяет сделать строгий вывод об однозначной связи увеличения активности теломеразы и прогрессии заболевания. Теломеразная активность высока как в трансформированных HTLV-I клетках, так и в лимфоцитах, полученных от больных лейкемией/лимфомой, по сравнению с нетрансформированными или нормальными клетками [149].

В регуляции транскрипции hTERT участвует белок Tax вируса HTLV-I, который, несмотря на то, что является онкогеном, может угнетать экспрессию гена hTERT [80, 150] при стимуляции деления клеток фитогемагглютинином (ФГА) в два раза за 3 сут. В отсутствие же ФГА и при наличии Tax происходит увеличение теломеразной активности на 25 % за то же время. При этом происходит активация экспрессии NF-kB, который, в свою очередь, активирует промотор hTERT [80]. Угнетение активности промотора hTERT осуществляется в результате конкуренции Tax с с-Мус за канонический участок связывания с-Мус в промоторе hTERT [150].

## SV 40 И АДЕНОВИРУСЫ

Ни SV 40, ни аденовирусы (АВ) не имеют отношения к этиологии естественных опухолей человека, но на модельных системах они могут участвовать в трансформации.

Для человека АВ не являются онкогенными, и на их основе даже пытаются делать средства доставки генетического материала для генотерапии. При этом экспрессии аденовирусного белка Е1А достаточно для иммортализации первичных клеток грызунов, а в присутствии второго онкогена Е2А или *gas* возможна их трансформация. Белок Е1А 243R и, в частности, второй экзон Е1А активируют промоторы hTERT и hTR. Эта активация может подавляться репрессором CtBP (C terminal binding protein), который сам по себе не влияет на базовый уровень экспрессии hTERT. Активация hTERT белком Е1А, вероятно, происходит через участки связывания Sp1 [151]. Эти данные говорят о необходимости предельно внимательного отношения к АВ и их неонкогенности/безвредности при использовании в терапии человека.

Вирус SV 40, бывший долгое время под подозрением как онкоген, для человека в настоящее время таковым не считается [152]. В человеческих клеточных линиях большой и малый раковые антигены SV40 могут приводить к трансформации [153]. Есть данные, что вирус SV40Т ускоряет появление теломеразной активности в клетках эпителия молочной железы человека. Но активность зависит от числа пересевов, т.е. активация теломеразы, вероятно, происходит опосредованно в результате учащения некоего случайного события, происходящего в результате нарушения клеточного метаболизма [135].

## ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИИ НА ЭКСПРЕССИЮ hTERT

Области гипоксии (кислородного голодания) раков характеризуются устойчивостью к терапии, генетической нестабильностью и усилением злокачественной прогрессии. Гипоксия может приводить к усилению теломеразной активности, например, в клеточных линиях рака шейки матки [154]. Промотор hTERT кодирует в своей основной части 2 участка HRE (hypoxia responsible element) – связывания гипоксия-индуцируемого фактора 1 (hypoxia-inducible factor-1, HIF-1) в областях -242 и -26 нп. Обнаружено, что эти участки действительно необходимы для активации hTERT с помощью HIF-1 [155]. Инкубация раковых клеточных линий в условиях недостатка кислорода приводит к сборке транскрипционного комплекса, включающего в себя HIF-1, p300/CBP, РНК-полимеразу II и TFIIB на промоторе hTERT в районе HRE участков. Суперэкспрессия HIF-1 в клеточной линии яичников приводит к более чем двукратному росту активности промотора hTERT. При росте раковой клеточной линии в условиях гипоксии без суперэкспрессии HIF-1 происходит перераспределение сплайс-форм мРНК hTERT (подробнее рассмотрено в главе «Регуляция сплайсинга hTERT») при очень незначительном увеличении количества суммарной мРНК hTERT [156].

## ПОСТТРАНСКРИПЦИОННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ hTERT

Необходимым для раков является поддержание длины теломера, и активность поддерживающей их теломеразы может не коррелировать с транскрипцией hTR и/или мРНК hTERT [32].

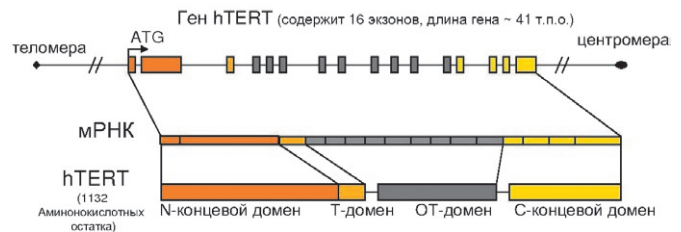


Рис. 5. Ген теломеразной обратной транскриптазы. Выделяют участки, кодирующие N- и C-концевые, обратнотранскриптазный (OT) и характерный для теломераз (T) домены [48]

## РЕГУЛЯЦИЯ СПЛАЙСИНГА ГЕНА hTERT

Ген теломеразной обратной транскриптазы состоит из 16 экзонов, при этом он занимает ~37 тыс. пар оснований геномной ДНК, из которых ~33 тыс. пар оснований приходится на интроны и ~4 тыс. соответствуют транскрипту [48] (рис. 5).

## ПРИРОДНЫЙ СПЛАЙСИНГ мРНК hTERT

Только полноразмерная мРНК hTERT обеспечивает активность теломеразы. Известно 13 альтернативных вариантов сплайсинга мРНК hTERT [48, 157–159]. Изоформа с т.н.  $\alpha$ -делецией (делеция 36 нуклеотидов в обратно-транскриптазном домене) при суперэкспрессии является доминантным ингибитором теломеразной активности [160, 161]. Этот вариант мРНК hTERT транскрибируется, и получающийся белок может включаться в теломеразный комплекс, существующий в виде димера (рис. 6).

Делеции  $\beta$  или  $\alpha + \beta$  не приводят к образованию активной теломеразы, но и не ингибируют ее [161]. В то же время при обработке бессмертной клеточной линии фактором TGF  $\beta$ 1 (transforming growth factor  $\beta$ 1) образуется  $\beta$ -вариант мРНК hTERT в результате альтернативного сплайсинга, и активность теломеразы падает [162]. Обратная ситуация может складываться в областях гипоксии раков: происходит перераспределение от  $\beta$ -варианта сплайсинга к активному транскрипту [156] (рис. 6).

Теломеразная активность в клетках линий остеосаркомы, экспрессирующих только полноразмерную мРНК, выше, чем в случае клеток с набором различных сплайсформ мРНК hTERT [54]. В ткани аденокарциномы желудка теломеразная активность возрастает, общее количество мРНК hTERT увеличивается по сравнению с окружающей нормальной тканью, а соотношение количеств  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\alpha + \beta$  форм в них одинаково, что указывает на отсутствие регуляции сплайсинга hTERT [163].

Вариант с делецией  $\gamma$  экспрессируется мало и не оказывает заметного эффекта на теломеразную активность в клеточных линиях, полученных из рака печени [159]. Делеции  $\alpha + \beta$ ,  $\beta$  и 4 вставки INS 1-4 [48, 157] вызывают преждевременную терминацию трансляции hTERT [161], как и варианты с делециями  $\beta + \gamma$ ,  $\alpha + \beta + \gamma$  [159]. Часть транскриптов, найденная недавно [158], пока не описана с точки зрения их влияния на активность теломеразы.

Вероятно, регуляция теломеразы с помощью сплайсинга является тканеспецифичной. При исследовании образцов тканей зародыша оказалось, что в сердце и пече-



Рис. 6. Различные варианты сплайсинга мРНК hTERT

ни теломеразная активность коррелирует с экспрессией гена hTERT, в почках она исчезает на 15 неделе развития, а транскрипты hTERT обнаруживаются на 21 неделе [164].

**ИСКУССТВЕННЫЙ СПЛАЙСИНГ**

Интрон первой группы из *Tetrahymena* может индуцировать новую РНК, которая заменяет с высокой точностью и специфичностью мРНК hTERT в результате транс-сплайсинга [165]. В клеточной линии рака простаты 2'-О-метил-РНК фосфотиоат олигонуклеотиды, подобранные к участку сплайсинга между 5 интроном и 6 экзоном в hTERT пре-мРНК, уменьшают количество полноразмерного транскрипта и одновременно увеличивают количество альтернативно-сплайсированного транскрипта, что приводит к снижению теломеразной активности. При этом уменьшается скорость роста, и через два дня обработки клетки начинают входить в состояние апоптоза [166].

**КЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ**

*In vitro* высокая активность теломеразы наблюдается в цитоплазматическом экстракте, а не в ядерном, хотя для работы теломеразы в клетке она должна быть локализована вместе с теломерами в ядре [167]. При этом *in vivo* GFP-содержащая теломераза локализуется в ядре [168].

При связывании NF-kB (p65 субъединица) с белком hTERT фактор некроза опухолей  $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ , он же TNF  $\alpha$ ) индуцирует перенос из цитоплазмы в ядро hTERT, связанный с NF-kB [169].

Белок 14-3-3, отвечающий за ядерную локализацию, связывается с теломеразой. Доминант-негативный 14-3-3 направляет в цитоплазму hTERT, в норме локализованный в ядре. Мутантный hTERT, не способный связываться с 14-3-3, локализуется в цитоплазме. 14-3-3 мешает связываться белку CRM1 с NES-мотивом (nuclear export signal, сигнал экспорта из ядра). Ингибирование CRM1/экспортин1 пути ядерного экспорта, как и нарушение NES-мотива, приводит к уменьшению локализации hTERT в цитоплазме [170].

hTERT большую часть клеточного цикла не локализуется в нуклеолах, тельцах Кахала или на теломерах. В S-фазе клеточного цикла hTERT перемещается в нуклеоли, затем в тельца Кахала и затем на теломеры [15, 16].

**ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ И ДЕФОСФОРИЛИРОВАНИЕ hTERT**

Фосфорилирование теломеразной обратной транскриптазы протеинкиназой Ca (PKCa) требуется для активности теломеразы в клетках рака молочной железы [171]. Другая протеиназа этой группы, протеинкиназа Cz (PKC zeta), контролирует теломеразную активность в клетках рака носоглотки без влияния на экспрессию hTERT. Выключение активатора PKC zeta Cdc42/Rac1 приводит к уменьшению теломеразной активности [172] (рис. 6).

Фосфатаза PP2A ингибирует теломеразную активность в клетках рака молочной железы [173] (рис. 7).

Киназа Akt увеличивает активность теломеразы, фосфорилируя hTERT, в клетках линии меланомы [174]. Доминант-негативная мутантная Akt-киназа значительно снижает уровень теломеразной активности в клетках эндотелия. Также подавляет теломеразную активность ингибирование киназы PI3K (phosphoinositol 3-kinase), фосфорилирующей и активирующей Akt-киназу [175] (рис. 7).

Фосфорилирование влияет не только непосредственно на активность hTERT, но и на транскрипцию этого гена. Обработка клеток ингибитором PI3K или экспрессия в них доминант-негативной Akt-киназы ослабляет транскрипционную активацию промотора hTERT эстрогеном в клеточных линиях рака яичника человека [124].

Тирозин-киназа c-Abl, активируемая двухцепочечными разрывами ДНК, связывается с hTERT и фосфорилирует его, ингибируя активность. Облучение клеток ионизирующим излучением индуцирует фосфорилирование hTERT по c-Abl-зависимому механизму [176].

При окислительном стрессе hTERT экспортируется из ядра с помощью ГТФазы Ran. Для этого экспорта необходимо фосфорилирование hTERT киназой Src [177]. Этот механизм экспорта hTERT блокируется суперэкспрессией фосфатазы Shp-2 [178].

**РЕГУЛЯЦИЯ ТЕЛОМЕРАЗНОЙ РНК**

В тканях взрослых людей высокий уровень экспрессии теломеразной РНК обнаружен в первичных сперматоцитах и клетках Сертоли, средний уровень экспрессии – в лимфатических фолликулах, слабый уровень экспрессии – в эпителии, а в клетках нервной системы и тканях, происходящих из мезенхимы, экспрессия hTR отсутствует [179]. Заметный уровень экспрессии обнаружен в тонком кишечнике, яичниках, селезенке, тимусе, почках и простате. Низкий уровень экспрессии hTR наблюдается в мозге, печени, желудке, поджелудочной железе, легких и сердце [180].

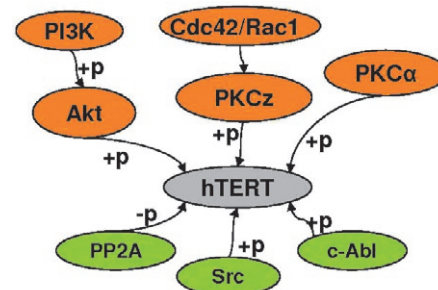


Рис. 7. Регуляция активности белка hTERT с помощью фосфорилирования/дефосфорилирования. Активаторы показаны оранжевым, ингибиторы зеленым. «+р» – фосфорилирование, «-р» – дефосфорилирование



В теломераза-положительных образцах опухолевых тканей наблюдали сильную экспрессию hTR, а в теломераза-негативных саркомах мягких тканей только половина экспрессировала hTR в различной степени. В теломераза-негативных опухолях нет связи между экспрессией hTR и пролиферативным статусом, длиной теломера и экспрессией hTERT [181]. Повышенная экспрессия hTR не связана с теломеразной активностью, например, в раке легких [30].

Методом *in situ* гибридизации определено, что в случае пищевода Баррета и дисплазии пищевода ранней стадии hTR отсутствует или экспрессируется со средней эффективностью, а на поздних стадиях развития дисплазии или рака эффективность экспрессии hTR велика [182]. В образцах рака легких в случае применения ОТ-ПЦР (обратной транскрипции и ПЦР) hTR выявляется в 90-100 % случаев образцов как раковых, так и нормальных тканей [30, 183]. При определении в раке легких методом гибридизации *in situ* hTR обнаруживался всего в 26 % раковых тканей, определенных гистологическим анализом, для некоторых образцов хорошо определяется разница между раковыми и нормальными тканями. Этим же методом определена экспрессия hTR в 41 % плоскоклеточной карциномы, 13 % и 17 % аденокарцином молочной железы и яичников, 43 % рака и 40 % предраковых поражений шейки матки [34]. К сожалению, неизвестна дальнейшая судьба пациентов с предраковыми поражениями, поэтому невозможно говорить об экспрессии hTR как о маркере развития онкогенного процесса. Для использования экспрессии hTR в качестве ракового маркера необходимо проводить точный количественный анализ в отличие от экспрессии hTERT или определения теломеразной активности.

При анализе нейроblastом в 9 из 12 образцах раков средних стадий и только в 2 из 8 образцов раков ранних стадий обнаружен высокий или средний уровень экспрессии hTR. Заболевание не прогрессировало у пациентов с низким уровнем экспрессии hTR или без нее. В случае 8 образцов рака (от 7 пациентов) со средним или высоким уровнем экспрессии hTR развитие болезни было неблагоприятным. Следует отметить, что в случае поздней стадии болезни с обширными метастазами (4 образца) экспрессия hTR была слабой. Экспрессия hTR в ганглионейробластомах и ганглионейромах ограничена только нервными клетками, в лимфоцитах она отсутствует. Таким образом, в нематастазирующих нейроblastомах экспрессия hTR оказалась хорошим прогностическим фактором [184].

Для рака Вильямса именно экспрессия hTR, но не hTERT, является предсказательным фактором дальнейшего развития. У 30 % пациентов с наибольшей экспрессией hTR (количественную оценку проводили ОТ-ПЦР в реальном времени) вероятность рецидива вдвое выше по сравнению с пациентами с наименьшим уровнем экспрессии hTR [185]. Также высокий уровень экспрессии hTR коррелирует с плохим прогнозом у пациентов с липосаркомой [42].

Повышение экспрессии hTR не всегда совпадает с повышением теломеразной активности [30]. hTR ингибирует протеинкиназу контрольных точек АТР. Подавление уровня экспрессии hTR приводит к остановке клеточного цикла в G1- и G2-фазах в результате активации белка p53

и протеинкиназы контрольных точек СНК1. Этот эффект не зависит от теломеразной активности. Возрастание экспрессии hTR в ответ на ультрафиолетовое облучение предотвращает активацию p53 и СНК1 в результате ингибирования активности АТР, тем самым ослабляя клеточный ответ на повреждение ДНК и позволяя клеткам проходить контрольную точку G2/М. Взаимодействия между hTR и АТМ не обнаружено, так что механизм этого ингибирования остается неизвестным [186].

**РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ ТЕЛОМЕРАЗНОЙ РНК**

Промотор hTR содержит ССААТ- и ТАТА-блоки рядом с участком старта транскрипции и ряд участков связывания: рецепторов глюкокортикоидов, прогестерона и андрогена; транскрипционных факторов AP1 и ETS [187]. Минимальный участок промотора теломеразной РНК человека -272-42 нп до участка старта транскрипции. Активность промотора максимальна при использовании участка до -463 нп, при использовании большего участка промотора происходит уменьшение транскрипции [187].

При проверке статуса метилирования промотора hTR 3 из 8 теломераза-положительных клеточных линий и обе теломераза-негативных оказались гиперметилированы, при этом в образцах операционных материалов метилирование промотора hTR не наблюдалось ни в раковых, ни в нормальных тканях. Таким образом, метилирование промотора скорее всего не связано с регулированием экспрессии hTR [181].

Промотор hTR содержит 4 участка связывания белков Sp1/Sp3 (рис. 8). Связывание Sp1 активирует промотор, а Sp3 ингибирует его [188]. Мутационный анализ показал, что участок до ССААТ-блока нужен для активации промотора hTR, а 3 участка после ССААТ отвечают за ингибирование промотора. Участок, находящийся сразу после ССААТ, имеет наибольший ингибирующий эффект, хотя и наименьшее сродство к Sp1. Это можно объяснить его близостью к участку связывания транскрипционного фактора NF-Y. Два участка, находящиеся после старта транс-

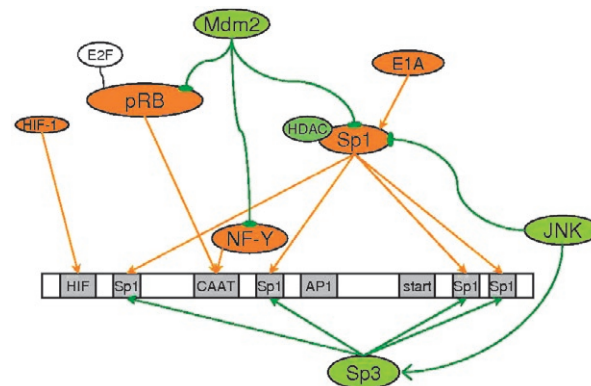


Рис. 8. Схема влияния трансаактиваторов промотора hTR. Зеленым обозначены ингибиторы промотора hTR, оранжевым – активаторы, без цвета – кофакторы. Стрелкой → обозначена активация следующего участника каскада, стрелкой T – ингибирование следующего участника каскада, без стрелки – совместное действие

крипции, подвергаются сложной регуляции, поскольку внесение мутаций в оба участка дает сильный активирующий эффект, не равный сумме эффектов мутаций участков по отдельности [189]. С другой стороны, по результатам работы [151] одновременное внесение мутаций в 4 участка связывания Sp1 не влияет на базовый уровень активности промотора hTR, хотя и нарушает его трансрегулирование.

Транскрипционный фактор NF- $\Upsilon$ , способный рекрутировать на промотор ряд компонентов комплекса РНК-полимеразы II [190], является основным активатором промотора теломеразной hTR. NF- $\Upsilon$  связывается с участком ССААТ промотора hTR, и при нарушении этого связывания активность промотора практически пропадает [189].

Активатором промотора hTR также является pRB. Для его действия необходим участок ССААТ. Активирование промотора hTR белком pRB снижается при использовании мутантных pRB, не способных связывать E2F, и пропадает при использовании мутанта  $\Delta 657$ , не способного связывать E2F и активировать транскрипцию генов [188].

Митоген-активируемая протеинкиназа киназы 1 – (MEKK1)/c-Jun-NH(2)-kinase (JNK) подавляет экспрессию hTR. Трансфекция постоянно активного киназного домена MEKK1, основного MAP3K в пути JNK, вызывает сильное ингибирование промотора hTR в ряде раковых клеточных линий. Угнетение промотора hTR киназой MEKK1 можно блокировать с помощью SP600125 – ингибитора JNK. Эффект ингибирования промотора hTR киназой MEKK1 может быть усилен коэкспрессией JNK дикого типа, но не коэкспрессией мутантной формы JNK, не способной фосфорилироваться. Котрансфекция Sp3 и MEKK1 дает аддитивный эффект ингибирования hTR. Обработка клеток SP600125 приводит к изменению соотношения количеств Sp1/Sp3 на промоторе в пользу Sp1, согласно иммунопреципитации. Таким образом, эта киназа способствует смещению баланса Sp1/Sp3, связанных с промотором, в пользу Sp3 без изменения в уровне экспрессии Sp1 и Sp3 и ингибированию промотора hTR [191].

Убиквитинлигаза Mdm2 уменьшает стабильность p53 и регулирует комплекс pRb/E2F [192]. Mdm2 взаимодействует с Sp1 *in vitro* и *in vivo* и ингибирует транскрипцию Sp1-активируемых промоторов. Mdm2 взаимодействует с промотором hTR *in vivo* и ингибирует его, причем участки

связывания Sp1 не принимают в этом участия. Mdm2 подавляет активацию, вызываемую pRb, NF- $\Upsilon$  и Sp1. Mdm2 и pRb, как и NF- $\Upsilon$ , могут взаимодействовать с аппаратом РНК-полимеразы II и в результате этого влиять на экспрессию hTR [190].

Ген теломеразной РНК содержит участок HRE, с которым связывается HIF-1. Суперэкспрессия в раковых клетках фактора HIF-1 приводит к почти двукратному росту активности промотора hTR через 6 ч после инкубации в условиях гипоксии и затем падению до нормального уровня в течение 4 ч. На промоторе hTR в раковой клеточной линии в условиях гипоксии собирается транскрипционный комплекс, включающий в себя HIF-1, p300, РНК-полимеразу II и TFIIB [156].

Аденовирусный белок E1A увеличивает экспрессию репортерной конструкции под контролем промотора hTR в 2.5 раза. Эта активация скорее всего осуществляется через участки связывания Sp1, поскольку их мутации приводят к исчезновению эффекта E1A. Активация промотора hTR белком E1A также ингибируется белком CtBP, но он не оказывает влияния на базовый уровень экспрессии hTR [151]

### ПОСТТРАНСКРИПЦИОННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ТЕЛОМЕРАЗНОЙ РНК

TR накапливается в тельцах Кахаля в клетках раковых линий, но не в клетках нормальных линий. Накопление hTR в тельцах Кахаля можно вызвать, экспрессируя в клетках hTERT [193]. Именно hTERT является ключевым фактором локализации hTR как в тельцах Кахаля, так и на теломерах [194]. Для накопления в тельцах Кахаля также необходим предшествующий процессинг 3'-конца hTR [195].

При онкогенезе может возрастать стабильность теломеразной РНК в клетках. При экспрессии hTERT в hTERT-негативных клетках период полураспада hTR возрастает в 1.6 раза. Вероятно, это происходит за счет связывания и стабилизации TR каталитической субъединицей [196].

### КОНТРОЛЬ ДОСТУПА ТЕЛОМЕРАЗЫ НА ТЕЛОМЕРЫ

Теломеры имеют выступающий 3'-конец, который, возможно, образует несколько структур: Т-петлю [197], G-квадруплексы [198, 199] (рис. 9). В Т-петле выступающий 3'-конец спарен с внутренней областью теломеры и стабилизирован белками [197]. G-квадруплексы образуются выступающим 3'-концом за счет Хугстейновских пар [198, 199]. У человека 6 белков (TRF1, TRF2, hRap1, TIN2, TPP1 и POT1) формируют так называемый шелтериновый комплекс, который является постоянным компонентом человеческого теломер [200].

Изменение уровня экспрессии белков шелтеринового комплекса резко отражается на длине теломер. Так, ингибирование TRF1 приводит к удлинению теломер в человеческих раковых клетках, а его суперэкспрессия приводит к укорочению теломер без изменения теломеразной активности *in vitro*. Уменьшение количества белка TIN2 или суперэкспрессия его мутантных аллелей, которые нарушают связывание TIN2 с TRF1 и TRF2, приводит к удлинению теломер. Суперэкспрессия TRF2 вызывает укорочение теломер, происходящее не только за счет *in vivo* ингибирования теломеразы, но и за счет увеличения скорости укорочения. Подавление TPP1 с помощью интерфери-

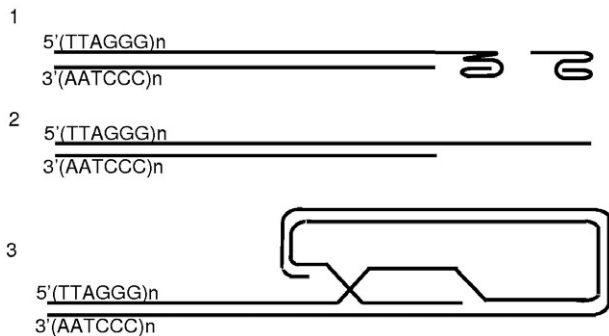


Рис. 9. Возможная организация концов теломер: 1 – примеры G-квадруплексов, 2 – выступающий 3'-конец (субстрат для теломеразы), 3 – Т-петля

рующей РНК или нарушение связывания TRP1–POT1 также приводит к удлинению теломер, сопровождающемуся потерей теломерами белка POT1 [200]. По данным других авторов, TRP1 и POT1 образуют комплекс с теломерной ДНК, который увеличивает активность и процессивность человеческой теломеразы. Существует предположение, что TRP1–POT1 переключается от ингибирования доступа теломеразы к теломере как компонент шелтерина на работу как фактор процессивности теломеразы во время удлинения теломер [201].

POT1 связывает одноцепочечную теломерную ДНК с высокой специфичностью, используя 2 ОВ-мотива (oligonucleotide/oligosaccharide-binding folds). Суперэкспрессия POT1 без первого ОВ-мотива приводит к быстрому удлинению теломер [200]. Уменьшение экспрессии hPOT1 также может приводить к удлинению теломер [202]. У другой группы исследователей экспрессия полноразмерного белка приводит к удлинению теломер [203]. Связывание рекомбинантного POT1 с теломерным олигонуклеотидом ингибирует связывание теломеразы. С другой стороны, POT1 *in vitro* способен разрушать квадруплексные структуры, которые образуются за счет Хугстеновского спаривания нуклеотидов в теломерной ДНК. Это может объяснять, как POT1 вносит положительный вклад в теломераза-зависимое удлинение теломер, поскольку G-квадруплексы представляются очень плохим субстратом для теломеразы. Разрушение G-квадруплексов также могут осуществлять хеликазы WRN или BLM семейства RecQ, которые взаимодействуют с POT1 [200]. У человека мутации в генах, кодирующих хеликазы WRN или BLM, приводят к развитию синдромов Блюма и Вернера соответственно, характеризующихся геномной нестабильностью [204].

Более длинные теломеры содержат больше шелтеринового комплекса, который может являться датчиком длины теломер. Связывание белка POT1 с шелтеринком может влиять на посадку POT1 на одноцепочечный участок теломерной ДНК. Также шелтерин может ингибировать теломеразу, облегчая образование T-петли, в которой 3'-конец недоступен [200].

Количество мРНК POT1 в случае рака желудка на начальных стадиях чаще уменьшается, а на поздних стадиях возрастает. Уровень экспрессии POT1 уменьшается в соответствии с укорочением теломер. Кроме того, ингибирование POT1 в клеточных линиях рака желудка с помощью антисмысловых олигонуклеотидов приводит к укорочению теломер, так же как и ингибирование теломеразной активности [205].

Посадка теломеразы на теломеры может регулироваться за счет образования/разрушения G-квадруплексов. Связывающий одноцепочечную ДНК белок RPA способен расплетать теломерные G-квадруплексы в модельных системах [206]. С другой стороны, RPA способен ингибировать теломеразную активность в модельных системах за счет связывания с теломер-имитирующим олигонуклеотидом [207]. Ингибирование теломеразы *in vitro* происходит и при удалении из смеси RPA, и при его большом избытке [208].

К сожалению, методы анализа теломеразной активности используют модельные системы с искусственным субстратом, без учета доступа на теломеры.

## РЕГУЛЯЦИЯ В ХОДЕ ОТВЕТА НА ИОНИЗИРУЮЩИЕ ИЗЛУЧЕНИЯ

При изучении процессов, происходящих при онкогенезе, нельзя обойти вниманием последствия воздействия на клетки различных видов излучений. С одной стороны, они способны провоцировать онкогенные процессы (УФ-облучение является провокатором рака кожи, проникающие ионизирующие излучения могут вызывать различные типы раков и т.д.), а с другой стороны, различные типы облучения применяются для борьбы с раком ( $\beta$ -частицы, нейтроны,  $\gamma$ - и рентгеновское облучение и т.д.). Поскольку активность теломеразы ассоциирована с большим числом раков, логичен вопрос, что же происходит с этой активностью при облучении. Также представляется интересным, может ли облучение вызывать активность теломеразы.

При изучении воздействия ионизирующего излучения на клеточную линию HeLa обнаружено, что теломеразная активность и количество мРНК hTERT возрастают в первые 24 ч, вплоть до двукратного превышения по сравнению с необлученными образцами, а потом за 72 ч возвращаются к исходному значению [209].

При воздействии на клетки гемопоэтической клеточной линии  $\gamma$ - и нейтрон/ $\gamma$ -излучения наблюдается увеличение теломеразной активности и количества мРНК hTERT, зависящее от дозы и интенсивности облучения. В случае нейтрон/ $\gamma$ -излучения сначала происходит уменьшение, а затем увеличение теломеразной активности. Влияние излучений разной энергии различается по величине и кинетике, но одинаково по механизму воздействия на клетки. Изменения в теломеразной активности не связаны ни с изменением клеточного цикла, ни с индукцией клеточной смерти, а являются последствиями специфических регуляторных ответов на ионизирующие излучения [210].

Клетки HeLa с укороченными теломерами после трансфекции DN-hTERT (доминантно-негативный мутантный hTERT) становятся более восприимчивыми к воздействию ряда химиотерапевтических агентов и облучению. Клетки, трансфицированные hTERT дикого типа, с более длинными теломерами проявляют большую устойчивость к химиотерапевтическим агентам и облучению [211].

УФ-облучение провоцирует теломеразную активность в различных типах клеток, включая клетки кожи. Кроме кожи, УФ-воздействию постоянно подвергаются глаза. Оказалось, что уровень теломеразной активности и количество мРНК hTERT и hTR возрастают только при получении хрусталиком определенной энергии УФ-излучения [212].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Знания о системе регуляции теломеразы позволят более эффективно разрабатывать методики и препараты для подавления теломеразной активности в раковых клетках. К сожалению, многие механизмы регуляции теломеразы тканеспецифичны. Выявление взаимосвязи системы регуляции теломеразы с другими онкогенами может помочь в разработке комплексной диагностики рака, позволяющей выявлять заболевание и определять тактику борьбы с ним на наименее агрессивной стадии.

Теломеразная активность является маркером активно делящихся клеток и одним из наиболее универсальных маркеров рака. ●



- Eur J Surg Oncol. 2002. 28(1). P. 14-18.
109. Jiang J.F., Liu W.J., Ding J. Acta Pharmacol Sin. 2000. 21(8). P. 759-764.
110. Oh S., Song Y., Yim J., Kim T.K. J Biol Chem. 1999. 274(52). P. 37473-37478.
111. Englert C. Trends Biochem Sci. 1998. 23(10). P. 389-393.
112. Fujimoto K., Kyo S., Takakura M., Kanaya T., Kitagawa Y., Itoh H., Takahashi M., Inoue M. Nucleic Acids Res. 2000. 28(13). P. 2557-2562.
113. Chang J.T., Yang H.T., Wang T.C., Cheng A.J. Mol Carcinog. 2005. 44(3). P. 183-192.
114. Goueli B.S., Janknecht R. Oncogene. 2003. 22(39). P. 8042-8047.
115. Maida Y., Kyo S., Kanaya T., Wang Z., Yatabe N., Tanaka M., Nakamura M., Ohmichi M., Gotoh N., Murakami S., Inoue M. Oncogene. 2002. 21(26). P. 4071-4079.
116. Xiao X., Phogat S.K., Sidorov I.A., Yang J., Horikawa I., Prieto D., Adelesberger J., Lempicki R., Barrett J.C., Dimitrov D.S. Leukemia. 2002. 16(9). P. 1877-1880.
117. Xiao X., Athanasou M., Sidorov I.A., Horikawa I., Cremona G., Blair D., Barrett J.C., Dimitrov D.S. Exp Mol Pathol. 2003. 75(3). P. 238-247.
118. Goueli B.S., Janknecht R. Mol Cell Biol. 2004. 24(1). P. 25-35.
119. Sikand K., Kaul D., Varma N. BMC Cell Biol. 2006. 7. P. 2.
120. Kyo S., Takakura M., Kanaya T., Zhuo W., Fujimoto K., Nishio Y., Orimo A., Inoue M. Cancer Res. 1999. 59(23). P. 5917-5921.
121. Misi S., Nanni S., Fontemaggi G., Cong Y.S., Wen J., Hirte H.W., Piaggio G., Sacchi A., Pontecorvi A., Bacchetti S., Faretta S., Faretta S. Mol Cell Biol. 2000. 20(11). P. 3764-3771.
122. Tanaka M., Kyo S., Takakura M., Kanaya T., Sagawa T., Yamashita K., Okada Y., Hiyama E., Inoue M. Am J Pathol. 1998. 153(6). P. 1985-1991.
123. Poole J.C., Andrews L.G., Tollesbol T.O. Gene. 2001. 269(1-2). P. 1-12.
124. Kimura A., Ohmichi M., Kawagoe J., Kyo S., Mabuchi S., Takahashi T., Ohshima C., Arimoto-Ishida E., Nishio Y., Inoue M., Kurachi H., Tasaka K., Murata Y. Oncogene. 2004. 23(26). P. 4505-4515.
125. Meeker A.K., Sommerfeld H.J., Coffey D.S. (1996) Endocrinology. 1996. 137(12). P. 5743-5746.
126. Meeker A.K. Urol Oncol. 2006. 24(2). P. 122-130.
127. Iczkowski K.A., Huang W., Mazzucchelli R., Pantazis C.G., Stevens G.R., Montironi R. Cancer. 2004. 100(2). P. 294-299.
128. Wang Z., Kyo S., Takakura M., Tanaka M., Yatabe N., Maida Y., Fujiwara M., Hayakawa J., Ohmichi M., Koike K., Inoue M. Cancer Res. 2000. 60(19). P. 5376-5381.
129. Zhang J., Tu Y., Smith-Schneider S. Cancer Cell Int. 2005. 5(1). P. 6.
130. Soda H., Raymond E., Sharma S., Lawrence R., Davidson K., Okamoto, Kohno S., Izbic E., Von Hoff D.D. Prostate. 2000. 43(3). P. 161-168.
131. Guo C., Armbruster B.N., Price D.T., Counter C.M. J Urol. 2003. 170(2 Pt 1). P. 615-618.
132. Kelley M.L., Keiger K.E., Lee C.J., Huibregtse J.M. J Virol. 2005. 79(6). P. 3737-3747.
133. Gewin L., Galloway D.A. J Virol. 2001. 75(15). P. 7198-7201.
134. Veldman T., Horikawa I., Barrett J.C., Schlegel R. J Virol. 2001. 75(9). P. 4467-4472.
135. Garbe J., Wong M., Wigington D., Yaswen P., Stampfer M.R. Oncogene. 1999. 18(13). P. 2169-2180.
136. Veldman T., Liu X., Yuan H., Schlegel R. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003. 100(14). P. 8211-8216.
137. Klingelhut A.J., Foster S.A., McDougall J.K. (1996) Nature. 1996. 380(6569). P. 79-82.
138. Lee D., Kim H.Z., Jeong K.W., Shim Y.S., Horikawa I., Barrett J.C., Choe J. J Biol Chem. 2002. 277(31). P. 27748-27756.
139. Qu Z.L., Zou S.Q., Cui N.Q., Wu X.Z., Qin M.F., Kong D., Zhou Z.L. World J Gastroenterol. 2005. 11(36). P. 5627-5632.
140. Zhang X., Dong N., Zhang H., You J., Wang H., Ye L. J Lab Clin Med. 2005. 145(2). P. 98-104.
141. Liu Y.C., Chen C.J., Wu H.S., Chan D.C., Yu J.C., Yang A.H., Cheng Y.L., Lee S.C., Harn H.J. Eur J Surg Oncol. 2004. 30(4). P. 384-390.
142. Sugimoto M., Tahara H., Ide T., Furuichi Y. Cancer Res. 2004. 64(10). P. 3361-3364.
143. Ding L., Li L.L., Yang J., Tao Y.G., Ye M., Shi Y., Tang M., Yi W., Li X.L., Gong J.P., Cao Y. Int J Biochem Cell Biol. 2005. 37(9). P. 1881-1889.
144. Yang J., Deng X., Deng L., Gu H., Fan W., Cao Y. J Exp Clin Cancer Res. 2004. 23(3). P. 495-506.
145. Chen F., Liu C., Lindvall C., Xu D., Ernberg I. Int J Cancer. 2005. 113(2). P. 284-289.
146. Verma S.C., Borah S., Robertson E.S. J Virol. 2004. 78(19). P. 10348-10359.
147. Re M.C., Monari P., Gibellini D., Ciancianini P., Dall'Aglio P.P., Vignoli M., Furlini G., Ramazzotti E., Bertazzoni U., Casoli C. J Hematother Stem Cell Res. 2000. 9(4). P. 481-487.
148. Uchida N., Otsuka T., Arima F., Shigematsu H., Fukuyama T., Maeda M., Sugio Y., Itoh Y., Niho Y. Leuk Res. 1999. 23(3). P. 311-316.
149. Bellon M., Nicot C. J Natl Cancer Inst. 2008. 100(2). P. 98-108.
150. Gabet A.S., Montreux F., Charneau P., Riou P., Duc-Dodon M., Wu Y., Jeang K.T., Wattel E. Oncogene. 2003. 22(24). P. 3734-3741.
151. Glasspool R.M., Burns S., Hoare S.F., Svensson C., Keith W.N. Neoplasia. 2005. 7(6). P. 614-622.
152. Shah K.V. Int J Cancer. 2007. 120(2). P. 215-223.
153. Moreno C.S., Ramachandran S., Ashby D.G., Laycock N., Plattner C.A., Chen W., Hahn W.C., Pallas D.C. Cancer Res. 2004. 64(19). P. 6978-6988.
154. Yatabe N., Kyo S., Maida Y., Nishi H., Nakamura M., Kanaya T., Tanaka M., Isaka K., Ogawa S., Inoue M. Oncogene. 2004. 23(20). P. 3708-3715.
155. Nishi H., Nakada T., Kyo S., Inoue M., Shay J.W., Isaka K. Mol Cell Biol. 2004. 24(13). P. 6076-6083.
156. Anderson C.J., Hoare S.F., Ashcroft M., Bilsland A.E., Keith W.N. Oncogene. 2006. 25(1). P. 61-69.
157. Kilian A., Bowtell D.D., Abud H.E., Hime G.R., Venter D.J., Keese P.K., Duncan E.L., Reddel R.R., Jeffersson R.A. Hum Mol Genet. 1997. 6(12). P. 2011-2019.
158. Saebø-Larssen S., Fosberg E., Gaudernack G. BMC Mol Biol. 2006. 7. P. 26.
159. Hisatomi H., Ohyashiki K., Ohyashiki J.H., Nagao K., Kanamaru T., Hirata H., Hibi N., Tsukada Y. Neoplasia. 2003. 5(3). P. 193-197.
160. Colgin L.M., Wilkinson C., Englezou A., Kilian A., Robinson M.O., Reddel R.R. Neoplasia. 2000. 2(5). P. 426-432.
161. Yi X., White D.M., Aisner D.L., Baur J.A., Wright W.E., Shay J.W. Neoplasia. 2000. 2(5). P. 433-440.
162. Cerezo A., Kalthoff H., Schuermann M., Schafer B., Boukamp P. J Cell Sci. 2002. 115(Pt 6). P. 1305-1312.
163. Barclay J.Y., Morris A.G., Nwokolo C.U. Dig Dis Sci. 2005. 50(7). P. 1299-1303.
164. Ulaner G.A., Hu J.F., Vu T.H., Giudice L.C., Hoffman A.R. Cancer Res. 1998. 58(18). P. 4168-4172.
165. Song M.S., Lee S.W. FEBS Lett. 2006. 580(21). P. 5033-5043.
166. Brambilla C., Folini M., Gandellini P., Daprai L., Daidone M.G., Zaffaroni N. Cell Mol Life Sci. 2004. 61(14). P. 1764-1774.
167. Morin G.B. Cell. 1989. 59(3). P. 521-529.
168. Wong J.M., Kusdra L., Collins K. Nat Cell Biol. 2002. 4(9). P. 731-736.
169. Akiyama M., Hideshima T., Hayashi T., Tai Y.T., Mitsiades C.S., Mitsiades N., Chauhan D., Richardson P., Munshi N.C., Anderson K.C. Cancer Res. 2003. 63(1). P. 18-21.
170. Seimiya H., Sawada H., Muramatsu Y., Shimizu M., Ohko K., Yamane K., Tsuruo T. EMBO J. 2000. 19(11). P. 2652-2661.
171. Li H., Zhao L., Yang Z., Funder J.W., Liu J.P. J Biol Chem. 1998. 273(50). P. 33436-33442.
172. Yeh Y.M., Pan Y.T., Wang T.C. Cancer Lett. 2005. 218(2). P. 207-213.
173. Li H., Zhao L., Funder J.W., Liu J.P. J Biol Chem. 1997. 272(27). P. 16729-16732.
174. Kang S.S., Kwon T., Kwon D.Y., Do S.I. J Biol Chem. 1999. 274(19). P. 13085-13090.
175. Breitschopf K., Zeiler A.M., Dimmeler S. FEBS Lett. 2001. 493(1). P. 21-25.
176. Kharbanda S., Kumar V., Dhar S., Pandey P., Chen C., Majumder P., Yuan Z.M., Whang Y., Strauss W., Pandita T.K., Weaver D., Kufe D. Curr Biol. 2000. 10(10). P. 568-575.
177. Haendeler J., Hoffmann J., Brandes R.P., Zeiler A.M., Dimmeler S. Mol Cell Biol. 2003. 23(13). P. 4598-4610.
178. Jakob S., Schroeder P., Lukosz M., Buchner N., Spyridopoulos I., Altschmied J., Haendeler J. J Biol Chem. 2008. 283(48). P. 33155-33161.
179. Yashima K., Maitra A., Rogers B.B., Timmons C.F., Rathi A., Pinar H., Wright W.E., Shay J.W., Gazdar A.F. (1998) Cell Growth Differ. 1998. 9(9). P. 805-813.
180. Feng J., Funk W.D., Wang S.S., Weinrich S.L., Avilov A.A., Chiu C.P., Adams R.R., Chang E., Allsopp R.C., Yu J., et al. Science. 1995. 269(5228). P. 1236-1241.
181. Guillerit I., Yan P., Guillou L., Braunschweig R., Coindre J.M., Benhattar J. Carcinogenesis. 2002. 23(12). P. 2025-2030.
182. Morales C.P., Lee E.L., Shay J.W. Cancer. 1998. 83(4). P. 652-659.
183. Nishio Y., Nakanishi K., Ozeki Y., Jiang S.X., Kameya T., Hebisawa A., Mukai M., Travis W.D., Franks T.J., Kawai T. Jpn J Clin Oncol. 2007. 37(1). P. 16-22.
184. Maitra A., Yashima K., Rathi A., Timmons C.F., Rogers B.B., Shay J.W., Gazdar A.F. Cancer. 1999. 85(3). P. 741-749.
185. Dome J.S., Bockhold C.A., Li S.M., Baker S.D., Green D.M., Perlman E.J., Hill D.A., Breslow N.E. J Clin Oncol. 2005. 23(36). P. 9138-9145.
186. Kedde M., le Sage C., Duursma A., Zlotorynski E., van Leeuwen B., Nijkamp W., Beijersbergen R., Agami R. J Biol Chem. 2006. 281(52). P. 40503-40514.
187. Zhao J.Q., Hoare S.F., McFarlane R., Muir S., Parkinson E.K., Black D.M., Keith W.N. Oncogene. 1998. 16(10). P. 1345-1350.
188. Zhao J.Q., Glasspool R.M., Hoare S.F., Bilsland A., Szatmari L., W.N. Keith W.N. Neoplasia. 2000. 2(6). P. 531-539.
189. Zhao J., Bilsland A., Hoare S.F., Keith W.N. FEBS Lett. 2003. 536(1-3). P. 111-119.
190. Zhao J., Bilsland A., Jackson K., Keith W.N. BMC Cancer. 2005. 5. P. 6.
191. Bilsland A.E., Stevenson K., Atkinson S., Kolch W., Keith W.N. Cancer Res. 2006. 66(3). P. 1363-1370.
192. Levav-Cohen Y., Haupt S., Haupt Y. Growth Factors. 2005. 23(3). P. 183-192.
193. Zhu Y., Tomlinson R.L., Lukowiak A.A., Terns R.M., Terns M.P. Mol Biol Cell. 2004. 15(1). P. 81-90.
194. Tomlinson R.L., Abreu E.B., Ziegler T., Ly H., Counter C.M., Terns R.M., Terns M.P. Mol Biol Cell. 2008. 19(9). P. 3793-3800.
195. Theimer C.A., Jady B.E., Chim N., Richard P., Breece K.E., Kiss T., Feigon J. Mol Cell. 2007. 27(6). P. 869-881.
196. Yi X., Tesmer V.M., Savre-Train I., Shay J.W., Wright W.E. Mol Cell Biol. 1999. 19(6). P. 3989-3997.
197. Griffith J.D., Comeau L., Rosenfield S., Stansel R.M., Bianchi A., Moss H., de Lange T. (1999) Cell. 1999. 97(4). P. 503-514.
198. Paeschke K., Juranek S., Simonsson T., Hempel A., Rhodes D., Lipps H.J. Nat Struct Mol Biol. 2008. 15(6). P. 598-604.
199. Tang J., Kan Z.Y., Yao Y., Wang Q., Hao Y.H., Tan Z. Nucleic Acids Res. 2008. 36(4). P. 1200-1208.
200. Hug N., Lingner J. Chromosoma. 2006. 115(6). P. 413-425.
201. Wang F., Podell E.R., Zaugg A.J., Yang Y., Baciou P., Cech T.R., Lei M. Nature. 2007. 445(7127). P. 506-510.
202. Ye J.Z., Hockemeyer D., Krutchinsky A.N., Loayza D., Hooper S.M., Chait B.T., de Lange T. Genes Dev. 2004. 18(14). P. 1649-1654.
203. Armbruster B.N., Linardic C.M., Veldman T., Bansal N.P., Downie D.L., Counter C.M. Mol Cell Biol. 2004. 24(8). P. 3552-3561.
204. van Brabant A.J., Stan R., Ellis N.A. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2000. 1. P. 409-459.
205. Kondo T., Oue N., Yoshida K., Mitani Y., Naka K., Nakayama H., Yasui W. Cancer Res. 2004. 64(2). P. 523-529.
206. Salas T.R., Petrusева I., Lavrik O., Bourdoncle A., Mergny J.L., Favre A., Saintome C. Nucleic Acids Res. 2006. 34(17). P. 4857-4865.
207. Cohen S., Jacob E., Manor H. Biochim Biophys Acta. 2004. 1679(2). P. 129-140.
208. Рубцова М.И., Скворцов Д.А., Петрусева И.О., Лаврик О.И., Спиринов П.В., Прасолова В.С., Киселев Ф.И., Донцова О.А. Выхимия. 2009. 174(1). P. 117-123.
209. Satra M., Tsougos I., Papanikolaou V., Theodorou K., Kappas C., Tsezou A. Int J Radiat Biol. 2006. 82(6). P. 401-409.
210. Perez Mdel R., Dubner D., Michelin S., Leteurtre F., Carosella E.D., Gisone P.A. Int J Radiat Biol. 2002. 78(12). P. 1175-1183.
211. Xi L., Chen G., Zhou J., Xu G., Wang S., Wu P., Zhu T., Zhang A., Yang W., Xu Q., Lu Y., Ma D. (2006) Apoptosis. 2006. 11(5). P. 789-798.
212. Colitz C.M., Barden C.A., Lu P., Chandler H.L. Vet Ophthalmol. 2006. 9(5). P. 379-385.

УДК 577.15

# Каталитические «биоловушки» против токсических эфиров, альтернативный подход для профилактики и лечения отравлений

П. Массон<sup>1,2</sup>#, Д. Рошу<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, Toxicology department, La Tronche, France

<sup>2</sup> Institute of Structure Biology, Molecular Biophysics Laboratory, Grenoble, France

<sup>3</sup> Bundeswehr Institute of Toxicology and Pharmacology, Munich, Germany

# e-mail: pmasson@unmc.edu

**РЕФЕРАТ** «Биоловушки» – это биофармацевтические препараты, которые вступают в специфические реакции с токсикантами. Ферменты, вступающие в реакцию с ядовитыми сложными эфирами, могут быть использованы в качестве биоловушек для нейтрализации токсических молекул еще до того, как эти молекулы достигнут физиологических мишеней. Биоловушки могут вводиться парентерально – с целью профилактики или превентивно, а также для экстренной помощи или после контакта с отравляющими веществами, приведшими к интоксикации. Эти ферменты также могут быть использованы в качестве активных компонентов местных средств защиты кожи и обеззараживающих растворов и могут наноситься непосредственно на кожу, слизистые оболочки или раны. Человеческая бутирилхолинэстераза – первая стехиометрическая биоловушка для безопасной и эффективной профилактики отравлений фосфорорганическими соединениями (ФОС), хотя для эффективной защиты требуются огромные количества этого дорогостоящего фермента. Таким образом, данный подход может быть существенно усовершенствован, если использовать «каталитические биоловушки», т. е. ферменты, способные катализировать реакцию деградации токсичных сложных эфиров. Подходящими каталитическими биоловушками являются генно-инженерные мутанты ферментов человека. К настоящему времени созданы эффективные мутанты человеческой бутирилхолинэстеразы, которые гидролизуют кокаин с высокой скоростью. Созданы также мутанты человеческих холинэстераз, способные гидролизовать ФОС, хотя их использование в медицинских целях ограничено в силу низкой активности. Человеческая параоксоназа, фермент плазмы крови с широкой специфичностью, определено наиболее перспективная фосфотриэстераза – биоловушка, однако биотехнологические основы ее производства пока находится в зачаточном состоянии. Потенциально биоловушками могут быть и другие ферменты. Потенциальными биоловушками являются вторичные биологические мишени ФОС, а также карбаматы. В частности, сывороточный альбумин реагирует с ФОС, а затем самореактивируется. Наконец, помимо ферментов человека, фосфотриэстеразы и оксидазы из различных бактериальных и эукариотических источников могут в принципе применяться для наружной терапии отравлений ФОС. Терапия этими ферментами возможна только после их модификации с целью достижения иммунологической совместимости.

**Ключевые слова:** «Каталитические биоловушки», карбаматы, кокаин, инженерия ферментов, ферментная терапия, фосфорорганические соединения

**Аббревиатуры:** АХЭ, ацетилхолинэстераза; БХЭ, бутирилхолинэстераза; ХЭ, холинэстераза; GMP, good manufacturing practice (надлежащая практика организации производства); ГГ, глутатион-S-трансфераза; ФОС, фосфорорганические соединения; ГАОК, гидролаза ангидрида органофосфорной кислоты; ПЭГ, полиэтиленгликоль; ПОН1, параоксоназа 1; ФТЭ, фосфотриэстераза; ЛВП, липопroteины высокой плотности.

## КОНЦЕПЦИЯ БИОЛОВУШКИ

Ферментные системы кожи, крови, внутренних органов участвуют в естественной защите человека от эндогенных и экзогенных ядов. Процессы детоксикации протекают в соответствии с разными механизмами, включая реакции окисления, гидролиза, конъюгации. Роль ферментов печени, легких и почек, цитохромов P450 (Brown et al., 2008), оксидаз, трансфераз (Miners et al., 2006), амидокарбоксилэстераз (Redinbo and Potter, 2005; Potter and Wadkins, 2006; Satoh

and Hosokawa, 2006) в метаболизме лекарств и ксенобиотиков хорошо известна. Признана также важность эстераз плазмы в инактивации многочисленных токсикантов. Наконец, становится все более очевидным, что каталитические антитела также могут играть эффективную роль в улавливании вредных молекул и радикалов (Belogurov et al., 2009). Перечисленные биокатализаторы образуют клеточный и циркуляционный барьеры, защищающие физиологические механизмы и системы от определенных токсикантов.

В данном обзоре мы сосредоточим внимание на тех эндогенных и экзогенных ферментах, которые реагируют с ядовитыми карбоксильными, органофосфорильными и карбамидовыми эфирами. Эти ферменты действуют как стехиометрические или как каталитические биоловушки (т. е. биокатализаторы, способные разлагать ядовитые вещества, при этом оставаясь неизменными в результате каталитического акта). Кроме того, мы рассмотрим ферменты, способные потенциально рассматриваться как каталитические биоловушки.

После краткого обзора каталитических биоловушек, используемых против кокаина, мы остановимся на биокатализаторах, которые следует использовать для профилактики и терапии при отравлении ФОС. Напомним, что отравления ФОС – одна из серьезных проблем здравоохранения, являющаяся причиной ежегодной смерти 200 000 человек (Eddleston et al., 2008). Кроме того, несмотря на то, что 185 государств присоединились к Конвенции о запрещении химического оружия, сохраняется угроза использования нервно-паралитических агентов и других ФОС в ходе военных действий и террористических актов.

За последние двадцать лет удалось добиться значительного прогресса в противодействии отравлениям ФОС (Aas, 2003; Albuquerque et al., 2006; Wetherell et al., 2007; Eyer et al., 2007; Thiermann et al., 2007). Однако классические фармакологические подходы уже достигли оптимального предела. Токсичность ФОС может быть нейтрализована путем понижения кожного всасывания, снижения концентрации ФОС в кровяном русле, что позволяет предотвратить перенос молекул ФОС к физиологическим мишеням (рис. 1). Было показано, что принципиально возможно нейтрализовать ФОС, используя стехиометрические ловушки первого поколения.

Принцип действия биоловушек второго поколения, каталитических, основан на идее непрерывного захвата и разложения ФОС в кровотоке – еще до того, как молекулы ФОС достигнут своих целей в центральной, периферической нервной и нервно-мышечной системах.

### ДЕТОКСИКАЦИЯ (-)КОКАИНА

В отличие от плазмы большинства млекопитающих, плазма крови человека не содержит карбоксилэстеразы (Li et al., 2005). Однако два фермента способны разлагать эфиры в кровотоке. Параоксоназа плазмы (ПОН1; ЕС 3.1.8.1) проявляет активность в отношении арилэстеразы, а бутирилхолинэстераза (БХЭ; ЕС 3.1.1.8), обладая широкой эстеразной специфичностью, играет роль в переработке, катаболизме и/или детоксикации многочисленных ядовитых сложных эфиров. Например, человеческая БХЭ гидролизует эфирсодержащие терапевтические и/или наркотические соединения, такие как сукцинилхолин и его длинноцепочечные производные (Grigoryan et al., 2008), аспирин, иринотекан, героин (Lockridge, 1990; Li et al., 2005). БХЭ плазмы также гидролизует пролекарства, такие как изосорбид (isosorbide), диаспиринат (diaspirinate), бамбутерол (bambuterol) (Li et al., 2005) и новое аспириновое пролекарство ISDA (Moriarty et al., 2008).

Было показано, что БХЭ плазмы, являющаяся ферментом, обладающим основным детоксицирующим действием по отношению к кокаину у человека (Inaba et al., 1978),

эффективно защищает животных от кокаиновой токсичности (Hoffman et al., 1996; Lynch et al., 1997). Однако, БХЭ гидролизует (-)кокаин медленно, с соотношением  $k_{cat}/K_m$  около  $0.28 \text{ мкМ}^{-1}\text{мин}^{-1}$ , так что в физиологических условиях большая часть принятой дозы кокаина достигает биологических целей и запускает токсические эффекты. Работы по сайт-направленному мутагенезу этого фермента позволили в последнее десятилетие добиться радикального увеличения гидролазной активности человеческой БХЭ в отношении кокаина. Первая мутантная форма, A328Y, имела каталитическую активность, в 4 раза превышающую активность человеческой БХЭ (Xie et al., 1999). Двойной мутант A328W/Y322A, предсказанный на основании данных моделирования методом молекулярной динамики и компьютерного лигандного докинга (computer-based ligand docking), имел еще более высокое соотношение  $k_{cat}/K_m = 8.5 \text{ мкМ}^{-1}\text{мин}^{-1}$  (Sun et al., 1999). Использование случайного мутагенеза позволило еще повысить  $k_{cat}/K_m$ .

Для дизайна новых мутантов БХЭ успешно применялся также подход с использованием моделирования активности переходного состояния. Высокоактивные мутанты в отношении (-)кокаина были разработаны с использованием данных о трехмерной структуре человеческой БХЭ и методом молекулярной динамики переходного состояния дезацилирования (Nicolet et al., 2003)

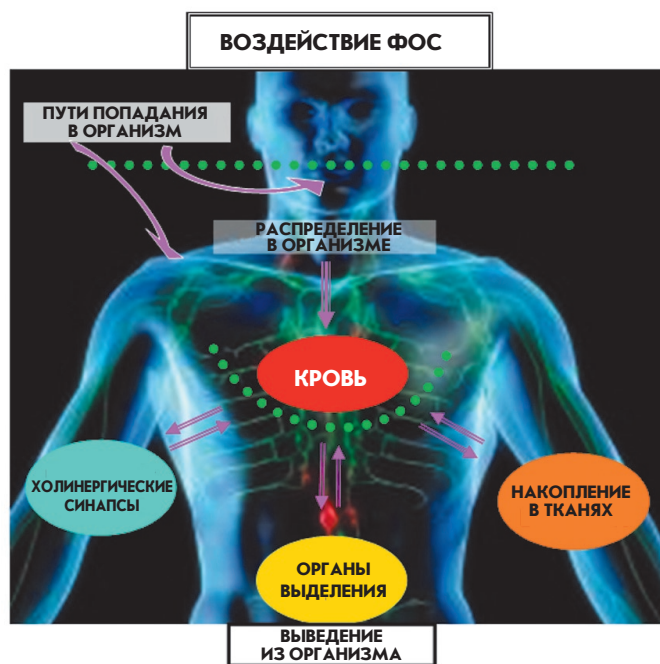
Самой эффективной оказалась комбинация четырех мутаций A199S/S287G/A328W/Y322G. Каталитическая эффективность созданного фермента в 456 раз превысила эффективность исходной БХЭ (Pan et al., 2005; Zheng and Zhan, 2008). Эта мутантная форма была конъюгирована с человеческим альбумином, что дало возможность улучшить фармакокинетические свойства такого гибрида ( $t_{1/2} = 8 \text{ ч}$  в плазме) без изменения каталитической эффективности (Brimijoin et al., 2008). Конъюгированный фермент уже при  $10 \text{ мг/кг}$  останавливал симптомы кокаиновой интоксикации у крыс при введении им летальной дозы кокаина ( $100 \text{ мг/кг}$ , интраперитонеально). Интересно, что он также блокировал индуцируемое кокаином восстановление влечения к наркотикам у крыс, которые ранее принимали кокаин. Совсем недавно комбинация пяти мутаций A199S/F227A/S287G/A328W/Y322G позволила создать еще более активный фермент (Zheng et al., 2008).

Таким образом, конъюгированные ферменты и новые мутантные формы БХЭ перспективны для эффективной терапии передозировок кокаина и лечения наркомании.

Альтернативной стратегией в случае кокаиновой наркомании может быть иммунофармакотерапия. Были получены моноклональные антитела, катализирующие гидролиз (-)кокаина (Landry et al., 1993; Larsen et al., 2004; McKenzie et al., 2007), но кинетические параметры каталитических антител еще требуют улучшения. Методы компьютерного моделирования (моделирование переходных состояний, расчет сдвига барьера свободной энергии) и мутагенез, как ожидается, позволят создать еще более эффективные биокатализаторы (Pan et al., 2008).

### ДЕТОКСИКАЦИЯ ФОС

Фосфорорганические соединения широко используются в качестве пестицидов. Некоторые ФОС являются лекарствами, другие – высокоактивными боевыми отравляю-



**Рис. 1.** Пути превращений фосфорорганических соединений в организме человека. Пути проникновения ФОС (нервные газы, пестициды) в организм человека являются абсорбция кожей, глазами и/или дыхательным трактом. Возможно также поглощение через желудочный тракт (самоотравление). Молекулы ФОС распространяются по организму из структурных элементов крови в органы и ткани, включая естественные депо, физиологические мишени и органы выделения (печень и почки). Холинэстеразы холинэргических синапсов являются первичными целями. Их ингибирование определяет токсичность ФОС и реакцию с вторичными мишенями (карбоксилэстеразами, серин-амидазы, пептидазы и другие серин/тирозин белки). Они могут быть ответственны за акцептирование ФОС по нехолинэргическому пути. Этот процесс может вызывать хроническую токсичность на уровне сублетальных эффектов даже при относительно низких поражающих концентрациях токсических агентов (Casida and Quistad, 2004; Costa, 2006)

щими веществами. ФОС являются необратимыми ингибиторами холинэстераз (ХЭ), ацетилхолинэстеразы (АХЭ, ЕС 3.1.1.7) и бутирилхолинэстеразы (рис. 2). АХЭ играет главную роль в холинэргической системе, завершая действие ацетилхолина. Таким образом, синаптические АХЭ являются первичными мишенями ФОС. Основной причиной острой токсичности ФОС является необратимое ингибирование АХЭ (Maxwell et al., 2006). Физиологическая функция БХЭ не ясна. При определенных условиях БХЭ может заменять АХЭ в нервной системе и в нервно-мышечных соединениях (Lockridge et al., 2009). Однако, как это было показано в предыдущем разделе, БХЭ имеет большое фармакологическое и токсикологическое значение.

Эндогенные ферменты участвуют в природной защите от токсичности ФОС. Присутствие ферментов, обезвреживающих ФОС, в коже снижает количество последних, проникающих в организм (Schallreuter et al., 2007). Некоторые вторичные мишени ФОС, обнаруженные в различных тканях, являются обезвреживающими ферментами, и они, безусловно, играют определенную роль в природной защите от ФОС (Wang et al., 1998; Nomura et al., 2005, 2008). Природные биологические ловушки крови вносят значительный вклад в снижение количества молекул ФОС, достигающих физи-

ологических мишеней. БХЭ является наиболее важной стехиометрической биологической ловушкой ФОС в плазме человека; ее концентрация около 50 нМ, а кажущаяся константа скорости второго порядка с ФОС составляет  $\approx 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ . ПОН1 плазмы человека проявляет активность, определяемую как «случайная» или «разнородная» (Costa and Furlong, 2002; Mackness et al., 2008). Хотя ее первичная функция, вероятно, заключается в том, что она является липофильной лактоназой (Khersonsky and Tawfik, 2005), участвующей в защите от атеросклероза (Shih et al., 1998; Watson et al., 1995), она гидролизует многочисленные ФОС. Было показано, что животные, у которых концентрация ПОН1 в плазме высока, являются относительно устойчивыми к ФОС (Kaliste-Korhonen et al., 1996). Напротив, мыши, нокаутные по ПОН1, очень чувствительны к ФОС (Shih et al., 1998). Альбумин проявляет низкую эстеразную активность и медленно реагирует с карбамильными и фосфорильными сложными эфирами. Однако его концентрация в крови и лимфе высока ( $\approx 0.6 \text{ mM}$ ), и, очевидно, он играет важную роль в детоксикации карбарильных соединений (Sogorb et al., 2007). Альбумин плазмы мог бы также играть роль в детоксикации ФОС (Tarhoni et al., 2007; Li et al., 2008) даже при токсикологически релевантных концентрациях (Sogorb et al., 2008).

ФОС также нейтрализуются карбоксилэстеразами (ЕС 3.1.1.1) тканей (печень) и окисляются оксидазами, такими как цитохром P450s, глутатион S-трансферазы, лакказы и пероксидазы. Глутатион S-трансферазы (ГТ; ЕС 2.5.1.18), ферменты с молекулярной массой 20-30 кДа, катализируют конъюгацию глутатиона (нуклеофильную атаку тиольной группы) с электрофильными субстратами. Эти ферменты вовлечены в процессы клеточной детоксикации эндогенных соединений и многочисленных ксенобиотиков; установлена их роль в устойчивости насекомых к инсектицидам. Детоксикация ФОС посредством ГТ происходит путем региоселективного дезалкилирования алкильной или арильной боковой цепи (Maturano et al., 1997). Имеются данные, что ГТ вносят вклад в детоксикацию ФОС у человека (Fujioka and Casida, 2007).

### СТЕХИОМЕТРИЧЕСКИЕ БИОЛОВУШКИ ПРОТИВ ФОС

Введение человеческой плазмы использовалось для лечения отравления ФОС. Была проведена оценка действия свежзамороженной плазмы на уровни активности холинэстеразы и ее влияния на терапевтические эффекты, полученные у пациентов при отравлении ФОС (Güven et al., 2004). Из результатов следует, что терапия плазмой может быть эффективным альтернативным или вспомогательным методом лечения. БХЭ плазмы и, возможно, другие распространенные ФОС-улавливающие белки плазмы (например, альбумин и ПОН1) внесли вклад в этот результат.

Исследования стехиометрических ловушек в основном сфокусированы на ферментах, специфично реагирующих с ФОС – холинэстеразах (Wolfe et al., 1987) и карбоксилэстеразах (Redindo and Potter, 2005; Fleming et al., 2007). Профилактическая инъекция ферментов, способных инактивировать ФОС, быстро позволила бы первым сталкивающимся с ними людям, т.е. пожарным, техникам по обезвреживанию неразорвавшихся боеприпасов и медицинским работникам, безопасно работать в среде, где присутству-



ют отравляющие вещества. Ожидается, что внутривенное или внутримышечное введение биоловухек людям, пораженным отравляющими веществами, значительно улучшит эффективность применяемых фармакологических мер противодействия (Ashani et al., 1998; Saxena et al., 2006). Однако ферментативная стехиометрическая нейтрализация ФОС требует введения значительных количеств дорогостоящих биоловухек, например, около 3 мг высокоочищенной БХЭ плазмы на кг веса пациента для того чтобы противодействовать нескольким LD<sub>50</sub> ФОС (Ashani and Pistinner, 2004). Широкомасштабное производство в условиях GMP – при разумной стоимости является предметом интенсивного исследования в Северной Америке.

Для массового производства человеческой БХЭ существует два промышленных GMP-процесса. Первый – очистка природного фермента из IV фракции Кона человеческой плазмы. Один литр плазмы дает менее одного миллиграмма GMP-БХЭ. Этот процесс был разработан Baxter Healthcare Corporation в США (www.baxter.com). Высокоочищенная БХЭ из человеческой плазмы была объявлена Управлением по пище и лекарствам (Food & Drug Administration, FDA) в 2006 г. новым исследовательским лекарством для обеспечения защиты от нервно-паралитических отравляющих веществ в США (Lenz et al., 2007; Saxena et al., 2007). Фаза I клинических испытаний на добровольцах будет завершена весной 2009 г., так что фермент вскоре может появиться на рынке. Второй процесс был разработан фирмой Nexia в Канаде (www.nexiabiotech.com); в нем использовался рекомбинантный человеческий фермент, продуцируемый в молоке трансгенных коз. Несколько грамм фермента могут быть секретированы в 1 л молока. Этот рекомбинантный фермент был назван Protexia™. С 2005 г. фирма Pharmathene в Мэриленд, США (www.pharmathene.com) разрабатывает Protexia™, ПЭГилированные производные рекомбинантного фермента (Huang et al., 2007) и конъюгированные белки (Huang et al., 2008).

Вторичные мишени ФОС и другие ферменты, взаимодействующие с последними, являются потенциальными стехиометрическими биоловухками. В частности, благодаря наличию большого числа остатков аминокислот, ковалентно связывающих молекулы ФОС (5 тирозинов и 2 серина) в молекуле альбумина, последний может достаточно эффективно выполнять роль биоловухки (Ding et al., 2008); реакционная способность остатков тирозина может быть повышена путем химической модификации, например, нитрования, вызывающего снижение значения рK<sub>a</sub> тирозина на несколько порядков (Masson et al., неопубликованные результаты). Модифицированный человеческий альбумин может положить начало новому поколению стехиометрических биоловухек. Наконец, экономичной альтернативой стехиометрическим биоловухкам на основе ферментов могли бы быть низкомолекулярные стехиометрические биоловухки. Так, из комбинаторной библиотеки случайных пептидов были выбраны некоторые серин- и тирозинсодержащие гексапептиды, реагирующие с флуоресцентным аналогом зарина (Landry and Deng, 2006; Deng et al., 2008).

#### КАТАЛИТИЧЕСКИЕ БИОЛОВУШКИ ПРОТИВ ФОС

Как было сказано, обезвреживание ФОС включает гидролиз фосфоэфирной связи гидролазами ангидридов ор-

ганофосфорных кислот (ГАОК), которые также называют фосфотриэстеразами (ФТЭ), или окисление до менее токсичных соединений путем дегградации их алкильной/арильной цепи. Хотя работы по каталитическим антителам достигли определенного успеха (Vayron et al., 2000; Jovic et al., 2005; Reshetnyak et al., 2007), наиболее перспективной областью исследований является ре-дизайн и инженерия ферментов, способных разлагать ФОС. Эти ферменты могли бы быть использованы в качестве каталитических биоловухек для профилактики и лечения отравлений ФОС, для местной защиты (Fisher et al., 2005) и для обеззараживания кожи, слизистых оболочек и открытых ран (Lejeune and Russell, 1999; Gill and Ballesteros, 2000). Для обеззараживания воды в биореакторах может быть использована иммобилизованная ГАОК (Simo et al., 2008), а также генетически модифицированные бактерии, ее продуцирующие. Эти компоненты могут быть внесены в установки по обеззараживанию воды с применением системы рециклирования и могут позволить слив воды без нанесения вреда окружающей среде. (Chen and Mulchandani, 1998).

#### ТРЕБОВАНИЯ К ФЕРМЕНТУ – ЭФФЕКТИВНОЙ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ БИОЛОВУШКЕ ПРОТИВ ФОС

Существует несколько общих требований к использованию ФОС-разлагающего фермента в качестве потенциального терапевтического агента при отравлении ФОС. Ферменты должны иметь широкий спектр активностей и в идеале обладать энантиоселективностью в отношении токсических стереоизомеров. Их массовое производство в условиях GMP должно быть реализуемо при разумных затратах. Должно быть возможно их длительное хранение в полевых условиях без потери активности. Конформационная стабильность может быть оптимизирована химической модификацией или добавлением стабилизаторов.

Другие требования зависят от пути введения, системы доставки или источников и технологии получения ферментов. Для парентерального введения следует помнить, что концентрация отравляющего вещества в крови, [ФОС], даже при самых тяжелых случаях отравления всегда очень низка, гораздо ниже K<sub>m</sub> фермента для субстратов ФОС, так что гидролиз ФОС в крови будет подчиняться кинетике псевдопервого порядка (Masson et al., 1998):  $v = k_{cat}/K_m[E]$  [ФОС]. Константа скорости псевдопервого порядка представляет собой произведение бимолекулярной константы скорости ( $k_{cat}/K_m$ ) и концентрации активных центров фермента [E]. Таким образом, чем выше каталитическая эффективность ( $k_{cat}/K_m$ ), тем меньше доза вводимого за очень короткое время (t) фермента для очистки крови от токсических молекул. Каталитическая эффективность ферментов может быть повышена на несколько порядков путем сайт-направленного мутагенеза или химической модификации (Griffiths and Tawfik, 2003; Hill et al., 2003). Концентрация фермента в крови, которая нужна для снижения [ФОС] до нетоксических значений за время t:  $[E] = X/(k_{cat}/K_m)$ , где X – это фактор, за счет которого [ФОС] снижается ( $X = \ln[FOC]_0/[FOC]_t$ ) (Masson et al., 2008). Поэтому следующая задача – это поддерживать концентрацию биоловухки, [E], в крови как можно более высокой в течение длительного времени. [E] контролируется фармакокинетикой фермента и/или частотой инъекций. Биодоступность

и биологическая стабильность вводимых парентерально стехиометрических или каталитических биологических также являются важными вопросами. Увеличение размера фермента путем полимеризации, конъюгации с альбумином, снижение микрогетерогенности гликанов и химические модификации поверхностей, контактирующих с растворителем, продлевают «функциональную жизнь» вводимых биологических. Быстрый клиренс гликопротеинов часто происходит из-за дефектов гликозилирования. Химические модификации могут существенно продлить пребывание этих препаратов в организме. Фармакокинетическое изучение гликопротеинов, вводимых парентерально животным, показало, что клиренс ферментов зависит от сиалилирования гликанов. Быстрое удаление асиалогликопротеинов из кровотока происходит из-за их захвата рецепторами галактозы, расположенными на поверхности гепатоцитов. Галактоза – это остаток, который является предшественником сиаловой кислоты на конце сложных гликанов. Фармакокинетическое изучение природных и рекомбинантных холинэстераз (ХЭ) подтвердило важность наличия остатков сиаловой кислоты на концах гликанов (Kronman et al., 1995; Saxena et al., 1998; Cohen et al., 2007; Kronman et al., 2007). Было установлено, что время полужизни ХЭ,  $t_{1/2}$ , обратно пропорционально числу незанятых мест присоединения сиаловой кислоты (Kronman et al., 2000). Для увеличения  $t_{1/2}$  рекомбинантных ХЭ все галактозилные остатки должны быть сиалилированы. Полное сиалилирование рекомбинантных ферментов может быть достигнуто путем выбора подходящей системы экспрессии (Chitlaru et al., 1998), способной синтезировать гликаны, аналогичные природным гликанам человеческих гликопротеинов, и путем добавления ингибиторов сиалидазы в среду клеточной культуры. Было обнаружено, что совместная экспрессия человеческой АХЭ и сиалилтрансферазы в клетках НЕК 293 продуцирует полностью сиалилированный рекомбинантный фермент (Kronman et al., 2000). Альтернативно полисиалилирование очищенных ферментов *in vitro* можно осуществлять с помощью сиалилтрансферазы или используя химический метод (Gregoriadis et al., 1999). ПЭГилирование также оказалось эффективной химической модификацией для увеличения полужизни рекомбинантных ХЭ (Cohen et al., 2006, 2007; Huang et al., 2007; Kronman et al., 2007; Mazor et al., 2008; Chilukuri et al., 2008).

Недавно рекомбинантный конъюгат человеческого альбумина с человеческой БХЭ с молекулярной массой 150 кДа показал значительно улучшенную фармакокинетику при введении молодым свиньям (для рекомбинантной 70 %-тетрамерной БХЭ  $t_{1/2}$  составило примерно 32 ч вместо  $\approx 3$  ч) (Huang et al., 2008).

Важным фактором является иммунотолерантность вводимых ферментов. Например, бактериальные ферменты в принципе не подходят для использования на людях, однако, их конъюгация с декстраном, ПЭГ или заключение в наноконтейнеры могут снизить антигенность и замедлить клиренс препарата.

Ферменты, использованные в качестве компонентов лосьонов для нанесения на кожу и глаза, а также иммобилизованные в пенах и на тканях для обеззараживания кожи и глаз (Gordon et al., 2003; Simo et al., 2008; Braue et al., 2002), способны активно действовать при условиях, ког-

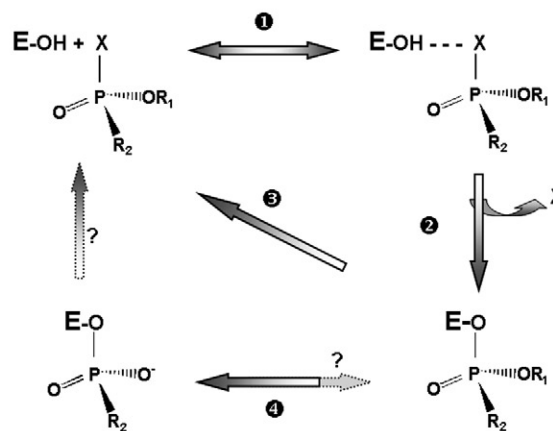


Рис. 2. Ингибирование холинэстераз ФОС и реактивация фосфорилированных ферментов. После образования обратимого комплекса между холинэстеразой и ФОС (этап 1), активированный серин (E-OH) фосфорилируется и далее происходит высвобождение ОР-уходящей группы X (этап 2). Фосфорилированная холинэстераза может быть реактивована нуклеофильными агентами, такими как оксимы (Прапидоксим, ММВ4, Обидоксим, HI-6 и др.), используемыми в качестве антидотов в случае неотложной помощи при отравлении ФОС. (Lundy et al., 2006; Worek et al., 2007) (этап 3). Фосфорилированные конъюгаты ферментов могут претерпевать деалкилирование (старение) (Shafferman et al., 1996; Viragh et al., 1997; Masson et al., 1999; Li et al., 2007; Carletti et al., 2008), результатом чего происходит образование необратимо ингибированного («состарившегося») фермента (этап 4). Деалкилирование может происходить очень быстро ( $t_{1/2} = 3$  мин при  $37^\circ\text{C}$  для ацетилхолинэстеразы человека фосфорилированной зоманом). В настоящий момент фармакологических путей реактивации «состарившейся» ацетилхолинэстеразы не существует

да местная концентрация ФОС может быть очень высокой. В этом случае порядок ферментативной реакции по [ФОС] стремится к нулю, так что скорость реакции близка к максимальной скорости,  $k_{\text{cat}}[\text{E}]$ . Таким образом, в этих условиях эффективность зависит от концентрации и константы скорости каталитической реакции фермента. Поэтому при использовании ферментов в качестве биологических в условиях наружного применения они должны обладать высокой каталитической активностью и должны быть высококонцентрированными. Совместная иммобилизация различных ферментов могла бы стать простым путем для расширения спектра ФОС, подвергаемых разложению. Это позволило бы обеспечить одновременное обезвреживание различных агентов. Конечно, следует учитывать возможность воздействия одновременно множества агентов. Конечно, следует учитывать возможность воздействия одновременно множества агентов, в частности, при экстремальных конфликтах, криминальных и террористических актах.

#### ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ОБЕЗВРЕЖИВАЮЩИЕ ФЕРМЕНТЫ

Холинэстеразы – ФОС могут рассматриваться как «полусубстраты» холинэстераз (ХЭ) (рис. 2). Когда фермент реагирует с карбоксильными эфирами, он временно ацилируется, эта ацильная группа быстро замещается на молекулу воды. Напротив, с фосфильными эфирами стереохимия промежуточного фосфорил-фермента ограничивает доступность воды к атому фосфора. Таким образом, спонтанный гидролиз фосфорилированного фермента очень замедлен или даже невозможен. Джарв (Jarv) выдвинул постулат, что введение второго нуклеофильного «полюса»

в активный центр могло бы активировать молекулу воды, которая могла бы затем атаковать атом фосфора, приводя к разрыву связи Р-серин (Jarv, 1989). Установление трехмерной структуры АХЭ из *Torpedo californica* (Sussman et al., 1991) открыло путь к рациональному повторному дизайну ХЭ. Так, была выдвинута гипотеза о возможности превращения ХЭ в органофосфорные гидролазы (ОФГ). Была выбрана человеческая БХЭ, поскольку ее активный центр больше ( $500 \text{ \AA}^3$ ), чем активный центр АХЭ ( $300 \text{ \AA}^3$ ), и она менее стереоспецифична. Молекулярное моделирование на основе структуры АХЭ из *Torpedo californica* было использовано для создания мутантов человеческой БХЭ. Второй нуклеофильный «полюс» был создан в оксианионной полости активного центра, где глициновый остаток был замещен на гистидин. Этот первый мутант, G117H, был способен гидролизовать параоксон, зарин, эктиофат и VX (Millard et al., 1995; Lockridge et al., 1997). Однако он неوبرатимо ингибировался зоманом, поскольку «старение» конъюгата шло быстрее, чем дефосфонирование. Механизм старения, т.е. дезалкилирование алкильной цепи на атоме фосфора, почти полностью выяснен (рис. 2). Эта реакция включает карбокатионное переходное состояние, которое стабилизируется остатками E197 и W82 активного центра и молекулами воды (Shafferman et al., 1996; Viragh et al., 1997; Masson et al., 1999; Nachon et al., 2005; Li et al., 2007). Мутация E197 на D, Q или G снижала скорость старения. Как ожидалось, двойной мутант G117H/E197Q был способен гидролизовать зоман (Millard et al., 1999). Однако каталитическая активность двойного мутанта была слишком слабой, чтобы представлять фармакологический интерес.

Обнаружение мухи (*Lucilia cuprina*), устойчивой к ФОС из-за содержания в ней мутированной карбоксилэстеразы в положении, гомологичном G117, а именно G137D, стимулировало исследование мутантов БХЭ на основе G117H. Хотя активность ГАОК мутанта G137D низкая, она компенсируется наличием фермента в органах насекомого (Newcomb et al., 1997). Было установлено, что нокаутные мыши по АХЭ и мутанты человеческой БХЭ, содержащей G117H, менее чувствительны к ФОС, чем мыши дикого типа (Wang et al., 2004). Хотя эти мыши экспрессируют мутант G117H во всех органах, в отличие от устойчивости *Lucilia cuprina*, их устойчивость к ФОС не может быть объяснена гидролизом ФОС, который является слишком медленным. Скорее всего, этот эффект связан с гидролизом избытка ацетилхолина, который накапливается в холинергических синапсах.

Более 60 двойных или тройных мутантов человеческой БХЭ с мутированным G117 (Schopfer et al., 2004) и мутантов человеческой АХЭ и АХЭ из *Bungarus fasciatus* были созданы с использованием того же подхода (Pouyet et al., 2006). Обзор этих работ см. Masson et al. (2008). Ни одна из мутированных ХЭ не была более активной, чем мутант G117, и мы получили доказательство, что мутации в положении G117 вызывают смещение и потерю функциональности оксианионной полости (Masson et al., 2007).

Однако компьютерный дизайн новых ОФГ мутантов ХЭ возможен при использовании нового подхода, названного «умный» дизайн направленного мутагенеза, основанный на моделировании переходных состояний. Как было указано, этот подход был успешно применен для создания мутан-

тов БХЭ, гидролизующих (-)кокаин с большой скоростью. Предполагается, что моделирование переходных состояний дефосфилирования поможет понять, как оптимизировать взаимодействия, способствующие продуктивному преодолению энергетического барьера дефосфилирования. Направленная эволюция ХЭ могла бы быть альтернативой компьютерным методам исследования. Однако, функциональная экспрессия ХЭ в дрожжах трудна (Durova et al., неопубликованные результаты) и пока не удается в бактериях.

Некоторые мутанты ХЭ, чувствительные к ФОС, не подверженные старению, полностью регенерируются с помощью оксимов. Так, мутанты ХЭ, связанные с регенераторами-оксимами, действуют как псевдо-катализаторы при замещении ФОС-фрагмента, связанного с ферментом. Эти сопряженные системы фермент-регенератор могли бы привести к новому семейству псевдо-каталитических биологических (Taylor et al., 2007; Kovarik et al., 2007, 2008; Mazor et al., 2008).

**Фосфотриэстеразы** – ферменты, которые катализируют гидролиз фосфоэфирных связей в ФОС, являются вездесущими, например, пролидаза, названная ангидролазой органофосфорных кислот (АОФК), была идентифицирована в штамме *Alteromonas* (Cheng et al., 1999), диизопротил-фторфосфатаза (ДФФаза) находится в изобилии в кальмаре *Loligo vulgaris*; параоксоназа-1 (ПОН1) содержится в человеческой плазме. Бактериальные ферменты, называемые фосфотриэстеразами (ФТЭ; ЕС 3.1.8.1) или иногда органофосфорными гидролазами (ОФГ), органофосфат-разлагающими ферментами (ОФРФ), отдадут предпочтение ФОС со связями Р-О или Р-S. ФТЭ являются членами суперсемейства амидогидролаз (Seibert and Raushel, 2005).

**Бактериальные фосфотриэстеразы** – Фосфотриэстеразы (ФТЭ; ЕС 3.1.8.1) кодируются геном разложения органофосфатов (*opd*), обнаруженным в *Pseudomonas diminuta*, *Flavobacterium sp.*, *Agrobacterium radiobacter*. Ген, аналогичный *opd*, был также найден в археях (Merone et al., 2005). ФТЭ из *Pseudomonas diminuta* – димерный фермент (72 kDa), содержащий два иона металла, из которых  $\text{Zn}^{2+}$  участвует в катализе (Carletti et al., в печати). Замена ионов  $\text{Zn}^{2+}$  в активном центре на ионы  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  и  $\text{Cd}^{2+}$  приводит к почти полному сохранению каталитической активности. После первого установления трехмерной структуры ФТЭ из *P. Diminuta* (Benning et al., 1994), был описан ряд кристаллических структур, кинетические и спектроскопические эксперименты. Катализ ФТЭ протекает по  $\text{SN}_2$  механизму с образованием пятикоординированного переходного состояния. Механизм нуклеофильной атаки и регенерации фермента широко обсуждается; функциональные роли катионов двухвалентных металлов и аминокислот в активном центре еще полностью не поняты (Aubert et al., 2004; Samples et al., 2007; Chen et al., 2007 Wong and Gao, 2007; Jackson et al., 2008). Недавно структура *SsoPox* (гипертермофильной ФТЭ из археи *Sulfolobus solfataricus*) дала новую информацию, которая позволила уточнить механизм (Elias et al., 2008; Del Vecchio et al., 2009). Природный субстрат ФТЭ до сих пор не идентифицирован (Ghanem and Raushel, 2005), и представляется, что ФТЭ происходит из лактоназы, активность ФТЭ рассматривается как побочная (Elias

Табл. 1. Каталитическая эффективность ( $k_{cat}/K_m$ ,  $M^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) различных природных и синтетических органофосфорных гидролаз в отношении к различным фосфорорганическим соединениям

Источник фермента	Параоксон	диизопропил-фторфосфат	Табун	Зарин	Зоман	GF	Echothiophate	VX
Человеческая ПОН1 Q192	$6.8 \times 10^5$ [a]	$4 \times 10^4$ [b]		$9.1 \times 10^5$ [c]	$2.8 \times 10^6$ [c]			+ [d]
Человеческая ПОН1 R192	$2.4 \times 10^6$ [a]			$7 \times 10^4$ [c]	$2.1 \times 10^6$ [c]			+ [d]
Человеческая рекПОН1 в 293Т					$6.2 \times 10^5 - 4.1 \times 10^6$ [e]			
рекПОН1млекопитающих G3C9	$7.2 \times 10^5$ [f]							
рекПОН1млекопитающих V346A					$8.7 \times 10^4$ [g]	$3.6 \times 10^5$ [g]		
Человеческая БХЭ G117H	$5.7 \times 10^3$ [h]	$5.2 \times 10^2$ [h]		$1.6 \times 10^2$ [i]	-		$1 \times 10^4$ [h]	$1.5 \times 10^3$ [i]
Карбоксилэстераза из мух G117D	$2 \times 10^5$ [l]							
<i>V. fasciatus</i> AChE HQT	64 [h]	$7.6 \times 10^2$ [h]					24 [h]	
<i>Loligo vulgaris</i> DFPase		$7.8 \times 10^7$ [k]		$2.4 \times 10^6$ [k]	$2.4 \times 10^6$ [k]			0 [k]
<i>P. diminuta</i> ОРАН	$2 \times 10^6$ [l]	$5.8 \times 10^6$ [m]		$4.8 \times 10^6$ [n]	$6 \times 10^5$ [o]	$5 \times 10^3$ [o]		$4 \times 10^4$ [p]
<i>Alteromonas</i> sp. JD6.5 ОРАА		$4.6 \times 10^7$ [q]			14.6 [r]			
<i>Alteromonas</i> sp. JD6.5 cloned				$5.8 \times 10^6$ [r]	$1 \times 10^7$ [r]	$6.2 \times 10^7$ [r]		
<i>Alteromonas undina</i>			21.8 [s]	30.4 [s]	$1.6 \times 10^2$ [s]	$1.3 \times 10^2$ [s]		
NG108-15 гибридные клетки					$2.5 \times 10^3$ [t]			

[a] Smollen et al., 1991; [b] Masson et al., 1998; [c] Davis et al., 1996; [d] C.A. Broomfield, неопубликованные результаты; [e] Yeung et al., 2008, с 4мя стереоизомерами зомана; [f] Harel et al., 2004; [g] Amitai et al., 2006; [h] Poyot et al., 2006; [i] Lockridge et al., 1997; [j] Newcomb et al., 1997; [k] Hartlieb and Ruterjans 2001; [l] Kuo et al., 1997; [m] Lai et al., 1995; [n] Dumas et al., 1990; [o] Hoskin et al., 1995; [p] Rastogi et al., 1997; [q] Cheng et al., 1999; [r] Cheng et al., 1994; [s] DeFranck et al., 1993; [t] Ray et al., 1988.

et al., 2008). В то время как каталитическая эффективность ФТЭ для параоксона, наилучшего субстрата, идентифицированного в настоящее время, достигает контролируемого диффузией предела, она низка в отношении нервно-паралитических агентов на основе ФОС (табл. 1). Между тем, направленная эволюция ФТЭ показала, что замена только трех аминокислот значительно повышает каталитическую эффективность для аналога зомана на 3 порядка (Hill et al., 2003).

Многочисленные исследования посвящены возможностям ФТЭ при ее использовании для обеззараживания, защиты кожи и биосенсорного детектирования ФОС (Lejeune and Russell, 1999; Gill and Ballesteros, 2000; Létant et al., 2005; Ghanem and Raushel, 2005; Karnati et al., 2007). Было показано, что введение ФТЭ до или после воздействия ФОС улучшает предварительное и текущее лечение отравления ФОС (Doctor and Saxena, 2005). Было показано, что *opdA* улучшает выживание после отравления высокотоксичными органофосфорными пестицидами (Bird et al., 2008). Для предотвращения слишком быстрой фармакокинетики и/или иммунологического ответа введенных бактериальных ферментов, ФТЭ можно ПЭГилировать (Jun et al., 2007, 2008) или инкапсулировать. Первые попытки по использованию ФТЭ, инкапсулированной в стерически стабилизированных липосомах, были многообещающими, так как обеспечивали защиту крыс от многих LD<sub>50</sub> органофосфорных пестицидов (Petrikovics et al., 2004). Альтернативно детоксикация крови может быть достигнута путем

экстракорпоральной циркуляции через полый волокнистый картридж, покрытый иммобилизованной ФТЭ (Masson et al., неопубликованные результаты).

ФТЭ, возможно, могли бы быть использованы для защиты кожи в качестве активных компонентов средств местной защиты кожи или ковалентно присоединенные к ороговевшему слою эпидермиса (Parsa and Green, 2001). Термостабильные ФТЭ из термофильных бактерий (Merone et al., 2005; Elias et al., 2008; Del Vecchio et al., 2009) или мутированные/сконструированные высокостабильные ферменты из мезофильных бактерий являются перспективными для использования при местной защите и обеззараживании. ФТЭ была также включена в добавки для латексного покрытия биозащитных поверхностей. Было показано, что такие добавки на основе ФТЭ для красок и покрытий сохраняют каталитические параметры и стабильность фермента (McDaniel et al., 2006). Для обеззараживания и восстановления отравленной среды альтернативный подход, заключающийся в фиторазложении трансгенными растениями (например, табаком), экспрессирующими бактериальную ФТЭ, рассматривается в качестве потенциально дешевого, безопасного и эффективного метода (Wang et al., 2008).

Человеческая параоксоназа-1 – ПОН1 является гликозилированным кальцийзависимым ферментом с молекулярной массой 45 кДа, экспрессируемым в основном в печени и связывающимся исключительно с липопротеинами высокой плотности в ассоциации с другими аполипопро-

теинами (рис. 3). ПОН1 проявляет генетический полиморфизм; самый известный – аллозим Q192R, который имеет значительное влияние на активность ПОН1 в отношении арилэфиров и ФОС (Smolen et al., 1991) (табл. 1). Химическая модификация и направленный мутагенез позволили идентифицировать аминокислотные остатки, необходимые для активности ПОН1 (Josse et al., 1999; Yeung et al., 2004; Khersonsky and Tawfik, 2006; Amitai et al., 2007; Tavori et al., 2008; Hu et al., 2009).

Попытки установления трехмерной структуры человеческой ПОН пока не удалось. Однако молекулярное моделирование (Fokine et al., 2003; Yeung et al., 2004) и кристаллическая структура гибридного рекомбинантного варианта ПОН1 млекопитающих, полученного направленной эволюцией (Harel et al., 2004), показали, что ПОН1 – это шестилопастный β-пропеллерный белок, аналогичный ДФФазе из *Loligo vulgaris* (Katsemi et al., 2005). Каталитический механизм ДФФазы был недавно описан (Blum et al., 2006). Подтверждение сходства механизма для активности человеческой ПОН1 значительно помогло бы дизайну более активных мутантов ПОН1. «Крышка» активного центра ПОН1 находится в контактной близости к области, которая, как предполагается, способствует связыванию ПОН1 с альфа-липопротеинами высокой плотности (ЛВП). Предполагается, что гидрофобный N-конец ПОН1 способствует его прикреплению к ЛВП, но точный способ связывания ПОН1 с ЛВП, а также других связанных с ЛВП белков, до сих пор неизвестен.

Как природный фермент плазмы, человеческая ПОН1 является наиболее перспективным кандидатом в качестве каталитической биоловушки для предварительной обработки и терапии отравлений ФОС (La Du, 1996; Rochu et al., 2007a). Таким образом, ПОН1 находится в центре интенсивных исследований по улучшению ее эффективности и функционализации. Для обеспечения противодействия интоксикации нервнo-паралитическими агентами каталитическая эффективность ПОН1 должна быть увеличена только на 1 или 2 порядка. Мутанты рекомбинантной ПОН1, полученные направленной эволюцией и проявляющие повышенную ОФГ-активность (Amitai et al., 2006), позволяют предположить, что эта цель вскоре будет достигнута. Однако нестабильность этих мутантов может помешать их биотехнологической разработке. Плазменная ПОН1 работает в сложной и динамической среде частиц ЛВП, которые содержат до 90 ассоциированных белков (Vaisar et al., 2007). Поэтому ПОН1 должна быть ассоциирована с аполипопротеиновыми партнерами для сохранения своей стабильной активной конформации (James and Deakin, 2004; Gaidukov and Tawfik, 2005).

Недавно был открыт человеческий фосфатсвязывающий белок (ЧФСБ) – аполипопротеин, который связывает неорганический фосфат в крови. Были установлены его трехмерная структура и полная аминокислотная последовательность (Morales et al., 2006; Diemer et al., 2008). Условия для разделения ЧФСБ и ПОН1 *in vitro* показали, что ЧФСБ прочно связан с ПОН1 (Renault et al., 2006). Более того, стабилизация активных форм человеческой ПОН1 с помощью ЧФСБ показывает, что последний действует как функциональный шаперон (Rochu et al., 2007b,c; Cléry-Barraud et al., 2009).

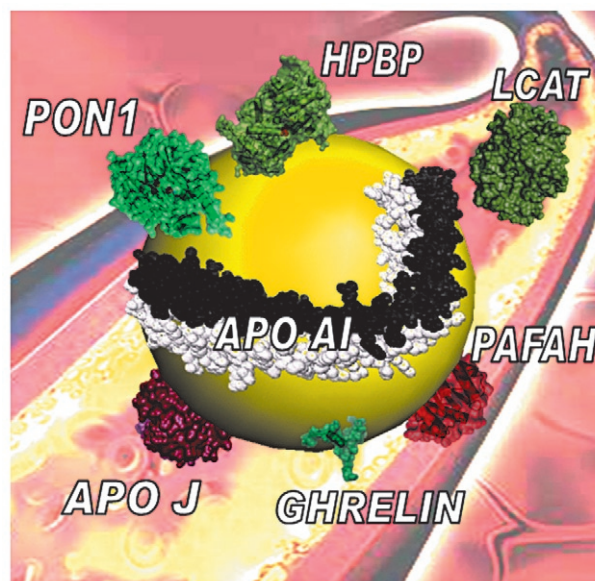


Рис. 3. Схематическое представление ПОН1-содержащих частиц липопротеинов высокой плотности (ЛВП). ЛВП представляют собой сферы диаметром около 10 нм с неполярным кором холестерина и триглицеридов, инкапсулированных в аполипопротеины и триглицериды, образующие монослой. Среди множества ЛВП-ассоциированных белков, вовлеченных в метаболизм липидов, регуляцию активности комплемента и ингибирование протеаз (Vaisar et al., 2007), некоторые ассоциированы с ПОН1. Было показано, что эти ЛВП со-выделяются с ПОН1 и являются контаминирующими составляющими очищенных фракций ПОН1.

PON1 – параоксоназа 1. HPBP – липопротеины высокой плотности. LCAT – лецитин-холестерин-ацетилтрансфераза. PAFAH – ацетилгидролаза тромбоцит-активирующего фактора. APO A1 – аполипопротеин А1. APO J – аполипопротеин J. GHRELIN – пептидный гормон грелин

Мы попытались осуществить со-кристаллизацию комплекса ПОН1-ЧФСБ. Для этого в качестве первой стадии нужно было создать гибридный ген для совместной экспрессии ЧФСБ и ПОН1 в *E. coli*. С этой целью на основе аминокислотной последовательности был синтезирован ген ЧФСБ. Ожидается, что совместная экспрессия, целью которой было способствовать правильной укладке активной ПОН1 и стабилизации активной функциональной конформации фермента, позволит получить кристаллизуемый комплекс ПОН1-ЧФСБ. Наконец, предполагается, что пригодные для дифракции кристаллы комплекса позволят установить трехмерную структуру природной человеческой ПОН1. Эта ключевая фаза будет первой ступенью на пути, ведущем к разработке стабильных мутантов человеческой ПОН1 с повышенной каталитической эффективностью против ФОС. То, что функциональная экспрессия человеческой ПОН1 представляется осуществимой (Stevens et al., 2008), могло бы облегчить биотехнологию ПОН1 и открыть новые перспективы.

**ДРУГИЕ ФЕРМЕНТЫ.** В биоразложении ФОС участвуют другие гидролазы, такие как ангидролазы органофосфорной кислоты (АОФК; ЕС 3.1.8.2) и органофосфат-разлагающие агенты (ОФРА) или пролидазы (ЕС 3.4.13.9). Пролидазы были впервые выделены из галофильных бактерий (*Alteomonas haloplanktis* и *A. sp.* JD6.5). Пролидаза из *A. sp.* JD6.5 – АОФК, проявляющая наивысшую из известных активностей против зомана ( $k_{cat} = 3100 \text{ c}^{-1}$ ), но неактивная

против VX (Cheng et al., 1999). ОФРА был включен в качестве активного ингредиента в Landguard™ OP-A, состав, разработанный для обработки воды ливневой канализации, обработки оборудования и обеззараживания почвы (Dawson et al., 2008). Поскольку эти применения связаны с сельскохозяйственным и лекарственным рынком, модификации, необходимые для детоксикации, будут относиться к небольшим, поскольку фермент может быть применен в форме порошка, жидкости или в связанных с матрицей формах.

Пролидаза была также выделена из печени человека. Она проявляет высокую каталитическую активность против зомана и проявляет гомологию последовательностей с пролидазой из *Aleromonas haloplanktis* (Wang et al., 1998). Человеческая пролидаза была клонирована и экспрессирована в *Sacharromyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*, и представляется, что она является одним из наиболее интересных ФОС-разлагающих ферментов для защиты от нервно-паралитических отравляющих веществ (Wang et al., 2005; Wang et al., 2006). Недавно открытая человеческая цитозольная аминопептидаза (АП; ЕС 3.4.11.9) могла бы также стать ценной каталитической биологической против органофосфатов и органофосфонатов (Hsu et al., 2008).

Лакказы (ЕС 1.10.3.2) представляют собой фенольные оксидоредуктазы грибов и используются для детоксикации множества ксенобиотиков (Richardt and Blum, 2008). Было обнаружено, что лакказы из *Pleurotus ostreatus* и *Chaetomium thermophilum* быстро разлагают VX и VR в присутствии 2,2'-азинобис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоната) (АБТС) в качестве медиатора (Amitai et al., 1998). Мы обнаружили, что лакказы из *Trametes versicolor* и *Coriolopsis polyzona* с АБТС проявляют аналогичные свойства против V-агентов (Trovaslet et al., неопубликованные результаты). Гем-содержащая хлорпероксидаза (ЕС 1.11.1.X) из *Caldaromyces fumago* с пероксидом в качестве совместного субстрата является другим эффективным ферментом, разлагающим VX (Amitai et al., 2003).

Эти ферменты представляют интерес для разрушения запасов химического оружия, восстановления почвы, обеззараживания материалов защитного снаряжения и воды, зараженной пестицидами и нервно-паралитическими агентами (Russel et al., 2003). В частности, фосфоротиолаты, такие как VX, относительно устойчивы к ФТЭ. Таким образом, окислительное расщепление связи P-S может быть достигнуто с помощью оксидаз, таких как лакказы. Эти ферменты могли бы быть использованы вместе с другими ФОС-разлагающими ферментами для обеззараживания и местной защиты кожи. Хотя работы по совместному действию оксидаз и гидролаз до сих пор не были осуществлены, ожидается, что окисление связанных с фосфором алкильных/арильных цепей оксидазами изменит энантиоселективность ФТЭ по отношению к родственным ФОС и поэтому улучшит эффективность каталитических биологических.

**Выводы и направления будущих исследований.** Ферменты, разлагающие ФОС, были выделены из человеческих органов, различных видов животных, грибов и бактерий. Идентификация и выделение новых природных ферментов, в частности, из насекомых, устойчивых к фосфорорганическим

пестицидам, и среди вторичных мишеней ФОС у человека, является активным полем для исследования. Потенциальные «экстремозимы» были открыты также в галофильных, термофильных и пьезофильных бактериях и в других экстремальных условиях окружающей среды (Merone et al., 2005; Feerer et al., 2007). Все эти ферменты могут быть выделены из их природных источников. Однако получение природных ферментов в условиях производства ГМР является дорогостоящим. Поэтому перспективными с точки зрения биофармацевтического применения являются, главным образом, рекомбинантные ферменты. Эти ферменты могут быть получены в прокариотических системах экспрессии (*E. coli*), в эукариотических системах экспрессии (дрожжи, насекомые, культуры клеток млекопитающих), в трансгенных животных (черви, кролики, козы), трансгенных растениях (томаты, картофель, табак), а также в бесклеточных биосинтетических системах. Целью современных исследований в области белковой инженерии является улучшение массового производства стабильных ферментов с низкими затратами.

Улучшение каталитической активности кокаингидролаз и АОФК, разлагающих нервно-паралитические отравляющие вещества и пестициды, *in vitro* и *in vivo* является весьма животрепещущей проблемой. Улучшение термодинамической стабильности для длительного хранения в растворе или в виде лиофилизированных форм и функциональная стабильность *in vivo*, улучшение иммунологической толерантности и биодоступности являются важными практическими задачами этой области. Молекулярное моделирование и моделирование переходного состояния, подходы с использованием направленного мутагенеза и направленной эволюции в комбинации с химической модификацией были успешно использованы для улучшения свойств ферментов в качестве каталитических биологических. (Bershtein and Tawfik, 2008). Наконец, фармакокинетические, токсикокинетические и иммунологические исследования на моделях животных, а затем на добровольцах позволят обосновать применение тех или иных ферментов в качестве активных терапевтических агентов. Множество ферментов будут включены в активные местные средства защиты кожи и инструменты для обеззараживания. Вскоре каталитические биологические займут свое место среди медицинских мер противодействия для профилактики и лечения острого отравления ФОС и лечения кокаиновой передозировки.

В будущем генная терапия могла бы противостоять ФОС. Эта стратегия представит возможность временно продуцировать гуманизированные ФОС-разлагающие ферменты в организме. Обнадеживающие результаты уже получены для человеческих АХЭ и БХЭ (Li et al., 2006; Chilukuri et al., 2008) и человеческой ПОН1 (Conwan et al., 2001; Fu et al., 2005; Bradshaw et al., 2005; Miyoshi et al., 2007; Guns et al., 2007; Zhang et al., 2008). Наиболее эффективным подходом представляется использование мутированных генов ПОН1, кодирующих фермент с высокой ОФГ-активностью против пестицидов и нервно-паралитических агентов. Некоторые исследования, используя различные векторы генной доставки у мышей, показали, что уровень ПОН1 в плазме повышается. Высокие уровни ПОН1 замедлили и даже предотвратили проникновение ФОС в мозг и сни-

зили симптомы атеросклероза (Conwanet et al., 2001; Fu et al., 2005; Bradshaw et al., 2005; Guns et al., 2008). Направленная доставка гена ПОН1 с использованием вектора на основе вируса Сендай ингибировала неонатальную гиперплазию после артериального повреждения у кроликов, которых кормили пищей с высоким содержанием жиров (Miyoshi et al., 2007). Перенос человеческого гена ПОН1Q мыши привел к эффективной экспрессии фермента, способного защитить

печень от окислительного стресса (Zhang et al., 2008). Таким образом, повышенная экспрессия ПОН1 с помощью генной терапии могла бы быть полезной для различных функций фермента. Между тем, и множественные, и неверно идентифицированные активности ПОН1 определенно указывают, что стратегия периодически повторяющегося введения высоких концентраций ПОН1 должна применяться с осторожностью. ●

#### Список литературы:

- Aas, P. (2003) *Prehosp. Disast. Med.* V18, P208.
- Afriat, L., Roodveldt, C., Manco, G., and Tawfik, D.S. (2006) *Biochemistry* V45, P13677.
- Albuquerque, E.X., Pereira, E.F.R., Aracava, Y., Fawcett, W.P., Oliveira, M., Randal, W.R., Hamilton, T.A., Kan, R.K., Romano, J.A., Jr., and Adler, M. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* V103, P13220.
- Amitai, G., Adani, R., Sod-Moriah, I., Rabinovitz, A., Vincze, H., Leader, H., Chefetz, B., Leibovitz-Persky, L., Friesem, D., and Hadar, Y. (1998) *FEBS Lett.* V438, P195.
- Amitai, G., Adani, R., Hershkovitz, M., Bel, P., Rabinovitz, I., and Meshulam, H. (2003) *J. Appl. Toxicol.* V23, P225.
- Amitai, G., Gaidukov, L., Adani, R., Yishay, S., Yacov, G., Kushnir, M., Teitlboim, S., Lindenbaum, M., Bel, P., Khersonsky, O., Tawfik, D.S., and Meshulam, H. (2006) *FEBS J.* V273, P1906.
- Amitai, G., Gupta, R.D., and Tawfik, D.S. (2007) *HFSP J.* V1, P67.
- Ashani, Y., Leader, H., Rothschild, N., and Dosoretz, C. (1998) *Biochem. Pharmacol.* V55, P159.
- Ashani, Y., and Pistinner, S. (2004) *Toxicol. Sci.* V77, P358.
- Aubert, S.D., Li, Y., and Raushel, F.M. (2004) *Biochemistry* V43, P5707.
- Belogurov, A., Kozyr, A., Ponomarenko, N. and Gabibov, A. (2009) *BioAssays*, in press.
- Benning, M.M., Kuo, J.M., Raushel, F.M., and Holden, H.M. (1994) *Biochemistry* V33, P15001.
- Bershtein, S., and Tawfik, D.S. (2008) *Curr. Opin. Chem. Biol.* V12, P151.
- Bird, S.B., Sutherland, T.D., Gresham, C., Oakeshott, J., Scott, C. and Eddleston, M. (2008) *Toxicology* V247, P88.
- Blum, M.-M., Löh, F., Richardt, A., Rüterjans, H., and Chen, J.C.-H. (2006) *J. Am. Chem. Soc.* V128, P12750.
- Bradshaw, G., Gutierrez, A., Miyake, J.H., Davis, K.R., Li, A.C., Glass, C.K., Curtiss, L.K., and Davis, R.A. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* V102, P11029.
- Braue, E.H., Hobson, S.T., Govardhan, C., and Khalaf, N. (2002) *U.S. Patent n° US 6,410,604 B1*, Jun. 25.
- Bramijoin, S., Gao, Y., Anker, J., Gliddon, L.A., LaFleur, D., Shah, R., Zhao, Q., Singh, M. and Carroll, M.E. (2008) *Neuropsychopharmacol.* V33, P2715.
- Brown, C.M., Reisfeld, B. and Mayeno, A.N. (2008) *Drug Metab. Rev.* V40, P1.
- Carletti, E., Li, H., Li, B., Ekstrom, F., Nicolet, Y., Loiodice, M., Gillon, E., Froment, M.T., Lockridge, O., Schopfer, L.M., Masson, P. and Nachon, F. (2008) *J. Am. Chem. Soc.* V130, P16011.
- Carletti, E., Jacquamet, L., Loiodice, M., Rochu, D., Masson, P., and Nachon, F. (2009) *J. Enz. Inhib. Med. Chem.*, in press.
- Casida, J.E., and Quistad, G.B. (2004) *Chem. Res. Toxicol.* V17, P983.
- Chen, S.-L., Fang, W.-H., and Himo, F. (2007) *J. Phys. Chem. B.* V111, P1253.
- Chen, W., and Mulchandani, A. (1998) *TIBTECH*, V16, P71.
- Cheng, T.-C., Harvey, S.P., and MacKenzie, A. (1994) in: *Proceedings of the 1993 ERDEC Scientific Conference on Chemical Defense Research AD-A286742*, P955.
- Cheng, T.-C., DeFrank, J.J., and Rastogi, V.K. (1999) *Chem.-Biol. Interact.* V119-120, P455.
- Chilukuri, N., Sun, W., Naik, R.S., Parikh, K., Tang, L., Doctor, B. and Saxena, A. (2008) *Chem. Biol. Interact.* V175, P255.
- Chilukuri, N., Duysen, E.G., Parikh, K., Sun, W., Doctor, B.P., Lockridge, O. and Saxena, A. (2008) *Chem.-Biol. Interact.* V175, P327.
- Chitlaru, T., Kronman, C., Zeevi, M., Kam, A., Harel, A., Ordentlich, A., Velan, B., and Shafferman, A. (1998) *Biochem J.* V336, P647.
- Cléry-Barrault, C., Renault, F., Leva, J., El Bakdouri, N., Masson, P., and Rochu, D. (2009) *Biochim. Biophys. Acta*, in press.
- Cohen, O., Kronman, C., Raveh, L., Mazor, O., Ordentlich, and A. Shafferman, A. (2006) *Mol. Pharmacol.* V70, P1121.
- Cohen, O., Kronman, C., Lazar, A., Velan, B., and Shafferman, A. (2007) *J. Biol. Chem.* V282, P35491.
- Costa, L.G., and Furlong, C.E. Eds. (2002). "Paraoxonase (PON1) In Health and Disease: Basic and Clinical Aspects". Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Costa, L.G. (2006) *Clin. Chim. Acta* V366, P1.
- Cowan, J., Sinton, C.M., Varley, A.W., Wians, F.H., Haley, R.W., and Munford, R.S. (2001) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* V173, P1.
- Davis, H.G., Richter, R.J., Keifer, M., Broomfield, C.A., Sowalla J., and Furlong, C.E. (1996). *Nature Genet.* V14, P334.
- Dawson, R.M., Pantelidis, S., Rose, H.R., and Kotsonis, S.E. (2008) *J. Hazard Mater.* V157, P308.
- DeFranck, J.J., Beaudry, W.T., Cheng, T.C., Harvey, S.P., Stroup, A.N., and Szafraniec, L.L. (1993) *Chem.-Biol. Interact.* V87, P141.
- Deng, S.X., Zhu, Z.Z., Vinogradov, M., Macdonald, J., Stojanovic, M.N. and Landry, D.W. (2008) *Bioscience Review* 2008, Hunt Valley, MD, USA, June1-6. P6.
- Diemer, H., Elias, M., Renault, F., Rochu, D., Contreras-Martel, C., Schaeffer, C., Van Dorselaer, A., and Chabrière E. (2008) *Proteins.* V71, P1708.
- Ding, S.-J., Carr, J., Carlson, E., Xue, W., Li, Y., Schopfer, L.M., Li, B., Nachon, F., Asajo, O., Thompson, C.M., Hinrichs, S.H., Masson, P., and Lockridge, O. (2008) *Chem. Res. Toxicol.* V21, P1787.
- Doctor, B.P., and Saxena, A. (2005) *Chem.-Biol. Interact.* V157-158, P167.
- Dumas, D.P., Durst, H.D., Landis, W.G., and Raushel, F.W. (1990) *Arch. Biochem. Biophys.* V277, P155.
- Eddelston, M., Buckley, N.A., Eyer, P., and Dawson, A.H. (2008) *Lancet*, V371, P597.
- Elias, M., Dupuy, J., Merone, L., Mandrich, L., Porzio, E., Moniot, S., Rochu, D., Lecomte, C., Rossi, M., Masson, P., Manco, G., and Chabrière E. (2008) *J.Mol. Biol.* V379, P1017.
- Del Vecchio, P., Elias, M., Merone, L., Graziano, G., Dupuy, J., Mandrich, L., Carullo, P., Fournier, B., Rochu, D., Rossi, M., Masson, P., Chabrière E. and Manco, G. (2009). *Extremophiles*, in press.
- Eyer, P., Szinicz, L., Thiermann, H., Worek, F., and Zilker, T. (2007) *Toxicology* V233, P108.
- Feerer, M., Golyshina, O., Beloqui, A., and Golyshin, P.N. (2007) *Current Opin. Microbiol.* V10, P207.
- Fisher, S., Arad, A., and Margalit, R. (2005) *Arch. Biochem. Biophys.* V434, P108.
- Fleming, C.D., Edwards, C.E., Kirby, S.D., Maxwell, D.M., Potter, P.M., Cerasoli, D.M., and Redingo, M.R. (2007) *Biochemistry* V46, P5063.
- Fokine, A., Morales, R., Contreras-Martel, C., Carpentier, P., Renault, F., Rochu, D., and Chabrière, E. (2003) *Acta Cryst. D* V59, P2083.
- Fu, A.L., Wang, Y.X., and Sun, M.J. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V328, P901.
- Fujioka, K., and Casida, J.E. (2007) *Chem. Res. Toxicol.* V20, P1211.
- Gaidukov, L., and Tawfik, D.S. (2005) *Biochemistry* V44, P11843.
- Ghanem, E., and Raushel, F.M. (2005) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* V207, P459.
- Gill, I., and Ballesteros, A. (2000) *Biotechnol. Bioeng.* V70, P400.
- Gordon, R.C., Doctor, B.P., Saxena, A., Feaster, S.R., Maxwell, D., Ross, M., Lenz, D., Lejeune, K., and Russell, A. (2003) *U.S. Patent n° US 6,642,037 B2*, Nov. 4.
- Gregoriadis, G., Fernandes, A. and McCormack, B. (1999) *S.T. P. Pharma Sci.* V9, P61.
- Griffiths, A.D., and Tawfik, D.S. (2003) *EMBO J.* V22, P24.
- Grigoryan, H., Halebyan, G., Lefebvre, B., Brasme, B. and Masson, P. (2008) *Biochim. Biophys. Acta*, V1784, P1818.
- Guns, P.-J., Van Assche, T., Verreth, W., Franssen, P., Mackness, B., Mackness, M., Holvoet, P., and Bult, H. (2008) *Brit. J. Pharmacol.* V153, P508.
- Güven, M., Sungur, M., Eser, B., Sari, I., and Altuntas, F. (2004) *Clin. Toxicol.* V42, P617.
- Harel, M., Aharoni, A., Gaidukov, L., Brumstein, B., Khersonsky, O., Meged, R., Dvir, H., Ravelli, R.B.G., McCarty, A., Toker, L., Silman, I., and Sussman, J. (2004) *Nat. Struct. Mol. Biol.* V11, P412.
- Hartlieb, J., and Rüterjans, H. (2001) *Biochim. Biophys. Acta* V1546, P312.
- Hill, C.M., Li, W.S., Thoden, J.B., Holden, H.M., and Raushel, F.M. (2003) *J. Am. Chem. Soc.* V125, P8990.
- Hoffman, R., Morasco, R. and Goldfrank, L. (1996) *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, V34, P259.
- Hoskin, F.C.G., Walker, J.E., Detbarn, W.D., and Wild, J.R. (1995) *Biochem. Pharmacol.* V49, P711.
- Hsu, Y.-T., Su, C.-Y., Du, H.-C., Jao, S.-C. and Li, W.-S. (2008) *Chem. Diversity* V5, P1401.
- Lynch, T., Mattes, C., Singh, A., Bradley, R., Brady, R. and Dretchen, K. (1997) *J. Appl. Pharmacol.* V145, P363.
- Hu, X., Jiang, X., Lenz, D.E., Cerasoli, D.M., and Wallqvist, A. (2009) *Proteins*. In press.
- Huang, Y.J., Huang, Y.J., Baldassarre, H., Wang, B., Lazaris, A., Leduc, M., Bilodeau, A.S., Bellemare, A., Côté, M., Herskovits, P., Touati, M., Turcotte, C., Valeanu, L., Lemée, N., Wilgus, H., Bégin, I., Bhatia, B., Rao, K., Neveu, N., Brochu, E., Pierson, J., Hockley, D.K., Cerasoli, D.M., Lenz, D.E., Karatzas, C.N., and Langermann, S. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* V104, P13603.
- Huang, Y.J., Lundy, P.M., Lazaris, A., Huang, Y., Baldassarre, H., Wang, B., Turcotte, C., Cote, M., Bellemare, A., Bilodeau, A.S., Brouillard, S., Touati, M., Herskovits, P., Begin, I., Neveu, N., Brochu, E., Pierson, J., Hockley, D.K., Cerasoli, D.M., Lenz, D.E., Wilgus, H., Karatzas, C.N., and Langermann, S. (2008) *BMC Biotechnol.* V8, P50.
- Inaba, T., Stewart, D.J. and Kalow, W. (1978) *Clin. Pharmacol. Ther.* V23, P547.
- Järv, J. (1989) in "Enzymes hydrolysing organophosphorus compounds" (E. Reiner, W.N. Aldridge, and F.C.G. Hoskin, Eds.), Ellis Horwood Ltd, Chichester, UK, P221.
- Jackson, C.J., Foo, J.-L., Kim, H.-K., Carr, P.D., Liu, J.-W., Salem, G., and Ollis, D.L. (2008) *J. Mol. Biol.* V375, P1189.
- James, R.W., and Deakin, S.P. (2004) *Free Rad. Biol. Med.* V37, P1986.
- Josse, D., Xie, W., Renault, F., Rochu, D., Schopfer, L.M., Masson, P., and Lockridge, O. (1999) *Biochemistry* V38, P2816.
- Jovic, F., Louise, L., Mioskowski, C., and Renard, P.Y. (2005) *Tetrahedron Lett.* V46, P6809.
- Jun, D., Kuca K., Bajgar, J., Hruby, M., Kucka, J., Renault, F., and Masson, P. (2007) *Toxicology*, V233, P235.
- Jun, D., Musilova, L., Nachon, F., Rochu, D., Renault, F., Masson, P. (2008) *Bioscience Review Meeting 2008*, Hunt Valley, MA, USA, 1-6 June 2008.
- Kaliste-Korhonen, E., Tuovinen, K., and Hänenen, O. (1996) *Hum. Exp. Toxicol.* V15, P972.
- Karnati, C., Du, H., Ji, H.-F., Xu, X., Lvov, Y., Mulchandani, A., Mulchandani, P., and Chen, W. (2007) *Biosens. Bioelectron.* V22, P2636.
- Katsemi, V., Lücke, C., Koepke, J., Löh, F., Maurer, S., Fritzsche, G., and Rüterjans, H. (2005) *Biochemistry* V44, P9022.
- Khersonsky, O., and Tawfik, D.S. (2005) *Biochemistry* V44, P6371.
- Khersonsky, O., and Tawfik, D.S. (2006) *J. Biol. Chem.* V281, P7649.

- 86.Kovarik, Z., Radic, Z., Berman, H.A., and Taylor, P. (2007) *Toxicology* V233, P79.
- 87.Kovarik, Z., Calic, M., Sinko, G., Bosak, A., Berend, S., Vrdoljak, A.L., and Radic, B. (2008) *Chem.-Biol. Interact.* V175, P173.
- 88.Kronman, C., Velan, B., Marcus, D., Ordentlich, A. Reuveny, S., and Shafferman, A. (1995) *Biochem. J.* V311, P959.
- 89.Kronman, C., Chitlaru, T., Elhanany, E., Velan, B., and Shafferman, A. (2000) *J. Biol. Chem.* V275, P29488.
- 90.Kronman, C., Cohen, O., Raveh, L., Mazor, O., Ordentlich, A., and Shafferman, A. (2007) *Toxicology* V233, P40.
- 91.Kuo, J.N., Chae, M.Y., and Raushel, F.M. (1997) *Biochemistry* V36, P1982.
- 92.La Du, B.N. (1996) *Nature Med.* V2, P1186.
- 93.Lai, K., Stolowich, N.J., and Wild, J.R. (1995) *Arch. Biochem. Biophys.* V318, P59.
- 94.Landry, D.W., Zhao, K., Yang, G. X. Q., Glickman, M. and Georgiadis, T.M. (1993) *Science*, V259, P1899.
- 95.Landry, D.W., and Deng, S.X. (2006) *United States Patent N° 20060216778*.
- 96.Larsen, N.A., de Prada, P., Deng, S.X., Mittal, A., Braskett, M., Zhu, X., Wilson, I.A. and Landry, D.W. (2004) *Biochemistry*, V43, P8067.
- 97.Léfant, S.E., Kane, S.R., Hart, B.R., Hadi, M.Z., Cheng, T.-C., Rastogi, V.K., and Reynolds, J.G. (2005) *Chem. Commun.* V7, P851.
- 98.Léjeune, K.E., and Russell, A. J. (1999) *Biotechnol. Bioengn.* V62, P659.
- 99.Lenz, D.E., Broomfield, C.A., Yeung, D.T., Masson, P., Maxwell, D.M., and Cerasoli, D.M. (2007) in "Chemical warfare agents: chemistry, pharmacology and therapeutics" (J.A. Romano, B. Luckey, and H. Salem Eds), CRC Press, Boca Raton, P175.
- 100.Li, B., Sedlacek, M., Manoharan, I., Boopathy, R., Duysen, E.G., Masson, P. and Lockridge, O. (2005) *Biochem. Pharmacol.* V70, P1673.
- 101.Li, B., Duysen, E.G., Poluektova, L.Y., Murrin, L.C., and Lockridge, O. (2006) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* V214, P152.
- 102.Li, H., Schopfer, L.M., Nachon, F., Froment, M-T, Masson, P., and Lockridge, O. (2007) *Toxicol. Sci.* V100, P136.
- 103.Li, B., Nachon, F., Froment, M.T., Verdier, L., Debouzy, J.C., Brasme, B., Gillon, E., Schopfer, L.M., Lockridge, O., and Masson, P. (2008) *Chem. Res. Toxicol.* V21, P421.
- 104.Lockridge, O. (1990) *Pharmac. Ther.* V47, P35.
- 105.Lockridge, O., Blong, R.M., Masson, P., Millard, C.B., and Broomfield, C.A. (1997) *Biochemistry* V36, P786.
- 106.Lockridge, O., Duysen, E. G. and Masson, P. (2009) In: *Anticholinesterase pesticides: metabolism, neurotoxicity, and epidemiology*, (Satoh, T. and Gupta, R.C., Eds), Elsevier, in press.
- 107.Lundy, P.M., Raveh, L., and Amitai, G. (2006) *Toxicol. Rev.* V25, P1.
- 108.Lynch, T., Mattes, C., Singh, A., Bradley, R., Brady, R. and Dretchen, K. (1997) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* V145, P363.
- 109.Mackness, B., Mackness, M., Aviram, M., and Paragh, G. Eds. (2008) "The paraoxonase: their role in disease development and xenobiotic metabolism". Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- 110.McKenzie, K.M., Mee, J.M., Rogers, C.J., Hixon, M.S., Kaufmann, G.F. and Janda, K.D. (2007) *J. Mol. Biol.* V365, P722.
- 111.Masson, P., Josse, D., Lockridge, O., Viguier, N., Taupin, C., and Buhler, C. (1998) *J. Physiol.* V92, P357.
- 112.Masson, P., Cléry, C., Guerra, P., Redzlob, A., Albaret, C., and Fortier, P.-L. (1999) *Biochem. J.* V343, P361.
- 113.Masson, P., Froment, M.T., Gillon, E., Nachon, F., Lockridge, O., and Schopfer, L.M. (2007) *Biochim. Biophys. Acta* V1774, P16.
- 114.Masson, P., Nachon, F., Broomfield, C.A., Lenz, D.E., Verdier, L., Schopfer, L.M., and Lockridge, O. (2008) *Chem.-Biol. Interact.* V175, P273.
- 115.Maturano, M.D., Bongibault, V., Willson, M., Kláčbá, A., and Fournier, D. (1997) *Tetrahedron* V53, P17241.
- 116.Maxwell, D.M., Brecht, K.M., Koplovitz, I., and Sweeney, R.E. (2006) *Arch. Toxicol.* V80, P756.
- 117.Mazor, O., Cohen, O., Kronman, C., Raveh, L., Stein, D., Ordentlich, A. and Shafferman, A. (2008) *Mol. Pharmacol.* V74, P755.
- 118.McDaniel, C.S., McDaniel, J., Wales, M.E., and Wild, J.R. (2006) *Prog. Organ. Coatings* V55, P182.
- 119.Merone, L., Mandrich, L., Rossi, M., and Manco G. (2005) *Extremophiles* V9, P297.
- 120.Millard, C.B., Lockridge, O., and Broomfield, C.A. (1995) *Biochemistry* V34, P15925.
- 121.Millard, C.B., Lockridge, O., and Broomfield, C.A. (1999) *Biochemistry* V37, P237.
- 122.Miners, J.O., Knights, K.M., Houston, J.B. and Mackenzie, P.L. (2006) *Biochem. Pharmacol.* V71, P1531.
- 123.Miyoshi, M., Nakano, Y., Sakagushi, T., Ogi, H., Oda, N., Suenari, K., Kiyotani, K., Ozono, R., Oshima, T., Yoshida, T., and Chayama, K. (2007) *Hypertens. Res.* V30, P85.
- 124.Morales, R., Berna, A., Carpentier, P., Contreras-Martel, C., Renault, F., Nicodeme, M., Chesne-Seck, M.-L. Bernier, F., Schaeffer, C., Diemer, H., Van-Dorselaer, A., Fontecilla-Camps, J.C., Masson, P., Rochu, D., and Chabrière, E. (2006) *Structure* V14, P601.
- 125.Moriarty, L.M., Lally, M.N., Carolan, C.G., Jones, M., Clancy, J.M. and Gilmer, J.F. (2008) *J. Med. Chem.* V51, P7991.
- 126.Nachon, F., Asajo, O.A., Borgstahl, G.E.O., Masson, P., and Lockridge, O. (2005) *Biochemistry* V44, P1154.
- 127.Newcomb, R.D., Campbell, P.M., Ollis, D.L., Cheah, E., Russell, R.J., and Oakeshott, J.G. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* V94, P7464.
- 128.Nicolet, Y., Lockridge, O., Masson, P., Fontecilla-Camps, J.C., and Nachon, F. (2003) *J. Biol. Chem.* V278, P41141.
- 129.Nomura, D.K., Leung, D., Chiang, K.P., Quistad, G.B., Cravatt, B.F., and Casida, J.E. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* V102, P6195.
- 130.Nomura, D.K., Fujioka, K., Issa, R.S., Ward, A.M., Cravatt, B.F., and Casida, J.E. (2008) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* V228, P42.
- 131.Pan, Y., Gao, D., Yang, W., Cho, H., Yang, G., Tai, Hh., and Zhan, CG. (2005) *Proc. Natl. Acad. USA* V102, P16656.
- 132.Pan, Y., Gao, D. and Zhan, C.G. (2008) *J. Am. Chem. Soc.* V130, P5140.
- 133.Parsa, R., and Green, H. (2001) in "Proceedings of the Internal Symposium on Applications of Enzymes in Chemical and Biological Defense". Orlando, FL.
- 134.Petrikovics, I., Papahadjopoulos, D., I., Hong, K., Cheng, T.C., Baskin, S.I., Jiang, J., Jaszberenyi, J.C., Logue, B.A., Szilasi, M., McGuinn, W.D., and Way, J.L. (2004) *Toxicol. Sci.* V77, P258.
- 135.Potter, P.M. and Wadkins, R. (2006) *Curr. Med. Chem.* V11, P1045.
- 136.Poyot, T., Nachon, F., Froment, M.T., Loidice, M., Wieseler, S., Schopfer, L.M., Lockridge, O., and Masson, P. (2006) *Biochim. Biophys. Acta* V1764, P1470.
- 137.Rastogi, V.K., Defranck, J.J., Cheng, T.-C., and Wild, J.R. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* V241, P294.
- 138.Ray, R. Boucher, L.J., and Lenz, D.E. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* V967, P373.
- 139.Redinbo, M.R., and Potter, P.M. (2005) *Drug Discov.Today* V10, P313.
- 140.Renault, F., Chabrière, E., Andrieu, J.P., Dublet, B., Masson, P., and Rochu, D. (2006) *J. Chromatogr. B* V836, P15.
- 141.Reshetnyak, A.V., Armentano, M.F., Ponomarenko, N.A., Vizzuso, D., Durova, O.M., Ziganshin, R., Serebryakova, M., Govorum, V., Gololobov, G., Morse, H.C., Friboulet, A., Makker, S.P., Gabibov, A.G. and Tramontano, A. (2007) *J. Am. Chem. Soc.* V129, P16175.
- 142.Richardt, A., and Blum, M.M. (2008) *Decontamination of warfare agents: enzymatic methods for the removal of B/C weapons*, Wiley-VCH, Berlin, 311 pages.
- 143.Rochu, D., Chabrière, E., and Masson, P. (2007a) *Toxicology* V233, P47.
- 144.Rochu D., Renault, F., Cléry-Barraud, C., Chabrière, E., and Masson P. (2007b) *Biochim. Biophys. Acta* V1774, P874.
- 145.Rochu D., Chabrière, E., Renault, F., Elias, M., Cléry-Barraud, C., and Masson P. (2007c) *Biochem. Soc. Trans.* V35, P1616.
- 146.Russel, A.J., Berberich, J.A., Drevon, G.F., and Koepsel, R.R. (2003) *Annu. Rev. Biomed. Engn.* V5, P1.
- 147.Samples, C.R., Raushel, F.M., and DeRose, V.J. (2007) *Biochemistry* V46, P3435.
- 148.Satoh, T. and Hosokawa, M. (2006) *Chem.-Biol. Interact.* V162, P195.
- 149.Saxena, A., Ashani, Y., Raveh, L., Stevenson, D., Patel, T., and Doctor, B.P. (1998) *Mol. Pharmacol.* V53, P112.
- 150.Saxena, A., Sun, W., Luo, C., Myers, T.M., Koplovitz, Lenz, D.E., and Doctor, B.P. (2006) *J. Mol. Neurosci.* V30, P145.
- 151.Saxena, A., Luo, C., Chilukuri, N., Maxwell, D.M. and Doctor, B.P. (2007) In: *Chemical Warfare Agents Chemistry, Pharmacology, Toxicology and Therapeutics*, (Romano, J.A., Luckey, B.J. and Salem, H., Eds), CRC Press, Boca Raton, FL, P145.
- 152.Schallreuter, K.U., Gibbons, N.C.J., Elwary, S.M., Parkin, S.M., and Wood, J.M. (2007) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V355, P1069.
- 153.Schopfer, L.M., Ticu-Boeck, A., Broomfield, C.A., and Lockridge, O. (2004) *J. Med. Chem. Def.* V2, P1.
- 154.Seibert, C.M., and F.M. Raushel, (2005) *Biochemistry* V44, P6383.
- 155.Shafferman, A., Ordentlich, A., Barak, D., Stein, D., Ariel, N., and Velan, B. (1996) *Biochem. J.* V318, P833.
- 156.Shih, D.M., Gu, L., Xia, Y.R., Navab, M., LiH, W.F., Hama, S., Castellani, L.W., Furlong, C.E., Costa, L.G., Fogelman, A.M., and Lusia, A.J. (1998) *Nature* V394, P284.
- 157.Smolen, A., Eckreson, H.W., Gan, K.N., Hailat, N., and La Du, B.N. (1991) *Drug. Metab. Dispos.* V19, P107.
- 158.Sogorb, M.A., Alvarez-Escalante, Carrera, V., and Vilanova, E. (2007) *Arch. Toxicol.* V81, P113.
- 159.Sogorb, M.A., Garcia-Arquelles, S., Carrera, V. and Vilanova, E. (2008) *Chem. Res. Toxicol.* V21, P1524.
- 160.Stevens, R.C., Suzuki, S.M., Cole, T.B., Park, S.S., Richter, R.J., and Furlong, C.E. (2008) *Proc. Natl. Acad. USA* V105, P12780.
- 161.Sun, H., Pang, Y.P., Lockridge, O. and Brimijoin, S. (2002) *Mol. Pharmacol.* V62, P220.
- 162.Sussman, J.L., Harel, M., Frolow, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L., and Silman, I. (1991) *Science* V253, P872.
- 163.Tahroni, M.H., Carter, W.G., and Ray, D.E. (2007) *Toxicology* V240, P173.
- 164.Tavori, H., Khatib, S., Aviram, M., and Vaya, J. (2008) *Bioorg Med. Chem.* V16, P7504.
- 165.Taylor, P., Reiner, E., Kovarik, Z., and Radic, Z. (2007) *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* V58, P339.
- 166.Thiermann, H., Szinicz, L., Eyer, P., Felgenhauer, N., Zilker, T., and Worek, F. (2007) *Toxicology* V233, P145.
- 167.Vaisar, T., Pennathur, S., Green, P.S., Gharib, S.A., Hoofnagle, A.N., Cheung, M.C., Byun, J., Vuletic, S., Kassim, S., Singh, P., Chea, H., Knopp, R.H., Brunzell, J., Geary, R., Chait, A., Zhao, X.Q., Elkou, K., Marcovina, S., Ridker, P., Oram, J.F., Heinecke, J.W. (2007) *J Clin Invest* V117, P746.
- 168.Vayron, P., Renard, P.Y., Taran, F., Créminon, C. Frobert, Y., Grassi, J., and Mioskovski, C. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* V97, P7058.
- 169.Viragh, C., Akhmetshin, R., and Kovach, I. (1997) *Biochemistry* V36, P8243.
- 170.Wang, Q.D., Sun, M.J., Zhang, H., and Huang, C.F. (1998) *J. Biochem. Mol. Toxicol.* V12, P213.
- 171.Wang, S.H., Zhi, Q.W. and Sun, M.J. (2005) *Arch. Toxicol.* V79, P253.
- 172.Wang, S.H., Zhi, Q.W., and Sun, M.J. (2006) *Toxicol in Vitro* V20, P71.
- 173.Wang X, Wu N, Guo J, Chu X, Tian J, Yao B, Fan Y. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V365, P453.
- 174.Wang, Y., Boeck, A.T., Duysen, E.G., van Keuren, M., Saunders, T.L., and Lockridge, O. (2004) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* V196, P356.
- 175.Watson, A.D., Berliner, J.A., Hama, S.Y., and La Du, B.N. (1995) *J. Clin. Invest.* V96, P2882.
- 176.Wetherell, J., Price, M., Munford, H., Armstrong, and S. Scott, L. (2007) *Toxicology* V233, P120.
- 177.Wolfe, A.D., Rush, R.S., Doctor, B.P., Koplovitz, I., and Jones, D. (1987) *Fundam. Appl. Toxicol.* V9, P266.
- 178.Wong, K.-Y., and Gao, J. (2007) *Biochemistry* V46, P13352.
- 179.Worek, F., Eyer, P., Aurbek, N., Szinicz, L., and Thiermann, H. (2007) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* V219, P226.
- 180.Xie W., Varkey-Altamirano, C., Bartels, C.F., Speirs, R.J., Cashman, J.R. and Lockridge, O. (1999) *Mol. Pharmacol.* V55, P83.
- 181.Simo, Y., Butnaro, O., Eisenkraft, A., Shrot, S., Rosman, Y., Dushnitsky, T. and Krivoy, A. (2008) *Crit. Rev. Biotechnol.* V28, P265.
- 182.Yeung, D.T., Josse, D., Nicholson, J.D., Khanal, A., McAndrew, C.W., Bahnsen, B.J., Lenz, D.E., and Cerasoli, D.M. (2004) *Biochim. Biophys. Acta* V1702, P67.
- 183.Yeung, D.T., Smith, J., Sweeney, R., Lenz, D., and Cerasoli, D. (2008) *J. Anal.Toxicol.* V32, 86.
- 184.Zhang, C., Peng, W., Jiang, X., Chen, B., Zhu, J., Zang, Y., Zhang, J., Zhu, T., and Qin, J. (2008) *J. Gene Med.* V10, P94.
- 185.Zheng, F., and Zhang, C.-G. (2008) *Org. Biomol. Chem.* V6, P836.
- 186.Zheng, F., Yang, W., Ko, M.-C., Liu, J., Cho, H., Gao, D., Tong, M., Tai, H-H., Woods, J.H. and Zhan, C-G. (2008) *J. Am. Chem. Soc.*, V130, P12148.



# XXI симпозиум «Современная химическая физика»



## ШКОЛА-КОНФЕРЕНЦИЯ ДЛЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ «ХИМИЧЕСКАЯ ФИЗИКА ДЛЯ НАНОБИОТЕХНОЛОГИЙ»

## II МОЛОДЕЖНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ «ФИЗИКО-ХИМИЯ НАНОКЛАСТЕРОВ, НАНОСТРУКТУР И НАНОМАТЕРИАЛОВ»

С 25 сентября по 6 октября в пансионате «Маяк» (Туапсе) состоится XXI симпозиум «Современная химическая физика». В этом году участников ждет много нового: насыщенная научная и деловая программы с участием известных специалистов, конкурсы для молодых ученых и многое другое.

### Научная программа

Основу научной Программы составят лекции, доклады и стендовые сессии по следующим направлениям современной химической физики:

- элементарные процессы;
- фотохимия и радиационная химия;
- химическая радиоспектроскопия;
- гомогенный и гетерогенный катализ;
- кинетика и динамика химических реакций;
- химическая физика поверхности;
- нанохимия, нанофизика и нанотехнологии;
- квантовая химия;
- высокомолекулярные соединения;
- биохимическая физика;
- нанобиология.

### Школы-конференции

В рамках симпозиума пройдут две школы-конференции для молодых ученых: «Химическая физика для нанобиотехнологий» и II молодежная конференция «Физико-химия нанокластеров, наноструктур и наноматериалов».

### Конкурсы для молодых ученых

Молодые ученые могут принять участие в широкой конкурсной программе по номинациям: на лучшую научную работу, на лучшее прикладное исследование с перспективами внедрения в производство, на лучшую работу молодых ученых. Для победителей сформирован специальный призовой фонд.

### Условия участия

Для участия в работе симпозиума необходимо оплатить организационный взнос.

Организационный взнос для научных сотрудников составляет 1000 рублей.

Организационный взнос для студентов, аспирантов составляет 800 рублей.

### Место проведения

Пансионат «Маяк», находится в 15 км от Туапсе в курортном поселке Шепси в живописной экологически чистой зоне, в 250 м от Черного моря.

### Контактная информация

e-mail: [article@chemphysics.ru](mailto:article@chemphysics.ru)  
Тел.: (495) 930-88-50, 930-87-07  
[www.chemphysics.ru](http://www.chemphysics.ru)

УДК 577.24

# Решение «ЖИЗНЬ-ИЛИ-СМЕРТЬ» В СИСТЕМЕ CD95: ОСНОВНЫЕ ПРО- И АНТИАПОПТОЗНЫЕ МОДУЛЯТОРЫ

**И. Лаврик<sup>#</sup>, П. Краммер**

Отдел Иммуногенетики, Немецкий Центр Исследований Рака, Гейдельберг, Германия

<sup>#</sup> e-mail: i.lavrik@dkfz-heidelberg.de

**РЕФЕРАТ** Апоптоз (программируемая клеточная смерть) является неотъемлемым свойством многоклеточных организмов. Существует два основных сигнальных пути инициации апоптоза: т.н. внешний, передаваемый через рецепторы смерти (death receptors, DR), и внутренний (митохондриальный). CD95 (Fas/APO-1) является одним из рецепторов смерти. Данный обзор посвящен механизмам передачи сигнала апоптоза через CD95 (Fas/APO-1) и свойствам ключевых белков апоптоза, содержащих эффекторный домен смерти (Death Effector Domain, DED): про-апоптотического белка прокаспазы-8 и анти-апоптотического белка (с-FLIP). Нарушение передачи сигнала апоптоза характерно для многих болезней, в т. ч. и для аутоиммунных заболеваний, а также для рака и СПИДа, поэтому изучение апоптоза имеет важнейшее значение для борьбы с этими заболеваниями.

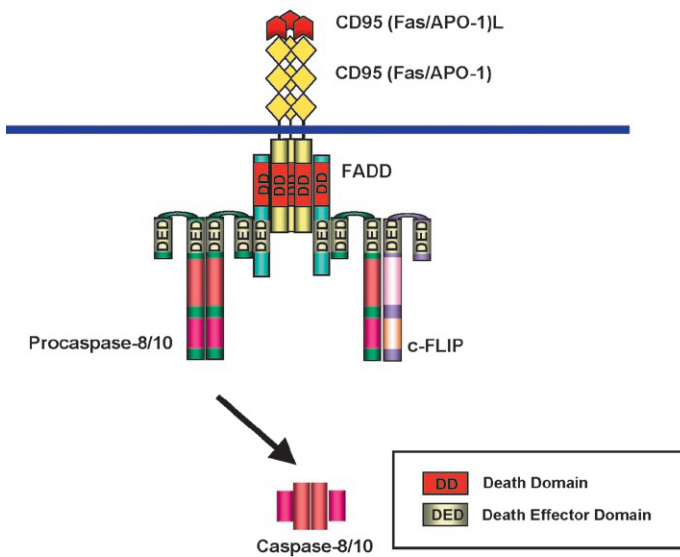
## ВВЕДЕНИЕ

Передача сигнала через CD95.

Белок CD95 (называемый также APO-1, Fas, fas antigen, TNFRSF6 и APT1) является представителем семейства рецепторов смерти, которое, в свою очередь, входит в состав суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей [1]. Цитоплазматическая часть рецепторов смерти содержит т. н. домены смерти (Death Domain, DD) [2, 3]. Домен смерти – это структурный мотив длиной около 80-100 аминокислотных остатков, который играет важную роль в передаче сигнала апоптоза. Домен смерти вместе с эффекторным доменом смерти (DED) и доменом активации и рекрутирования каспазы (CARD, caspase recruitment domain) по структурным характеристикам объединяют в суперсемейство домена смерти. Каждый из этих мотивов способен участвовать в т. н. гомотипических или однотипных белок-белковых взаимодействиях. При гомотипическом или однотипном взаимодействии домен смерти взаимодействует с другим доменом смерти (соответственно, CARD с CARD;

DD с DD) за счет шести антипараллельных  $\alpha$ -спиральных участков, которые входят в состав этих структурных мотивов.

Инициация апоптоза через рецептор CD95 происходит при связывании CD95 лиганда, CD95L (CD178) [4] или агонистических антител, таких как анти-APO-1 [5], с рецептором. При этом на клеточной мембране происходит формирование рецепторного комплекса, называемого сигнальным комплексом, индуцирующего клеточную смерть (death-inducing signaling complex, DISC) [6]. DISC состоит из рецепторов, которые, вероятно, образуют олигомерные структуры, белка-адаптера FADD/MORT1 (Fas-Associated Death Domain, Fas-ассоциированный домен смерти), прокаспазы-8 (FLICE, MACH, Mch5), прокаспазы-10 и белка с-FLIP (cellular FLICE inhibitory proteins, клеточные белки-ингибиторы FLICE) (рис. 1) [7-9]. Все белок-белковые взаимодействия в комплексе DISC основаны на гомотипических контактах. Белок-адаптер FADD связывается с рецептором CD95 за счет взаимодействий между доменами смер-



**Рис. 1.** Сигнальный комплекс, индуцирующий клеточную смерть (death-inducing signaling complex, DISC). DISC состоит из CD95 (изображено желтым), белка-адаптера FADD/MORT1 (Fas-Associated Death Domain, Fas-ассоциированный домен смерти) (изображено светло-голубым), про-каспазы-8/10 (изображено зеленым) и белка c-FLIP (cellular FLICE inhibitory proteins, клеточные белки-ингибиторы FLICE) (изображено фиолетовым). Домен смерти (DD) показан красным, эффекторный домен смерти (DED) показан светло-желтым

ти. Поскольку FADD также содержит эффекторный домен смерти, DED, именно за счет взаимодействий этого домена с DED доменами прокаспазы-8, прокаспазы-10 и с-FLIP происходит связывание в рецепторный комплекс DISC данных белков. После связывания в рецепторный комплекс прокаспазы-8 подвергается аутопротолитической активации с образованием активной формы каспазы-8. На следующих этапах апоптоза каспаза-8 расщепляет эффекторные каспазы-3, -6 и -7. При этом происходит активация каспаз-3, -6 и -7. За этим следует расщепление субстратов каспаз, которые представляют собой сотни клеточных белков, необходимых для нормального функционирования клетки. Их разрушение приводит к гибели клетки.

Белки комплекса DISC, содержащие эффекторный домен смерти, DED, играют центральную роль в регуляции апоптоза. Активация прокаспазы-8 в комплексе DISC завершается образованием активного гетеротетрамера каспазы-8, который инициирует апоптоз. Белок с-FLIP при связывании в комплекс DISC имеет противоположную функцию, а именно, он ингибирует активацию каспазы-8 в комплексе DISC, и, таким образом, ингибирует инициацию апоптоза. Таким образом, соотношение между двумя DED-белками, прокаспазой-8 и с-FLIP в комплексе DISC определяет решение «жизнь/смерть». Далее мы подробно остановимся на механизмах про- и антиапоптотического действия DED-белков прокаспазы-8 и с-FLIP.

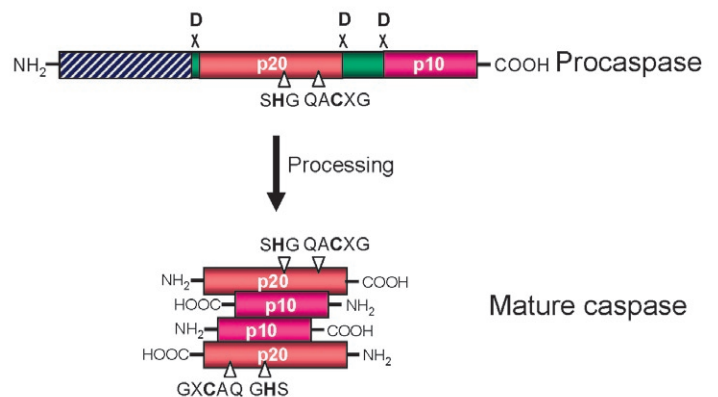
**ПРОКАСПАЗА-8-ПРО-АПОПТОТИЧЕСКИЙ БЕЛОК КОМПЛЕКСА DISC: ПРЕДСТАВИТЕЛЬ СЕМЕЙСТВА КАСПАЗ**

Прокаспазы-8 (FLICE, MACH, Mch5) принадлежит к семейству каспаз [7, 10]. Каспазы (caspases, от англ. *cysteiny*l *aspartate* specific proteases) – семейство цистеиновых

аспартат-специфичных протеаз, экспрессируются в клетке как неактивные зимогены, содержащие три основных участка: N-концевой домен (продомен) варьирующей длины, большую субъединицу (p20) и малую субъединицу (p10). Каспазы активируются в результате протеолитического расщепления после остатков аспартата, которые находятся между продомом и малой и большой субъединицей (рис. 2) [11]. Образующаяся активная каспаза представляет собой гетеротетрамер, состоящий из двух больших (~20 кДа) и двух малых субъединиц (~10 кДа), p10<sub>2</sub>-p20<sub>2</sub>. Субстратами каспаз являются многие белки, которые вовлечены в апоптоз и воспалительные процессы. По структурно-функциональным характеристикам выделяют три группы каспаз (рис. 3) [11]. Каспазы с большим продомом называют инициаторными и делят на две группы: каспазы, инициирующие процессы воспаления (группа I), и каспазы, инициирующие апоптоз (группа II). К третьей группе (группа III) относят каспазы с коротким продомом (20-30 аминокислотных остатков), которые получили название эффекторных каспаз.

Прокаспазы обычно присутствуют в клетке как неактивные зимогены, однако при запуске апоптоза они подвергаются протеолизу, за которым следует их активация [12]. Эффекторные каспазы активируются другими каспазами. Инициаторные прокаспазы активируются при взаимодействии нескольких инициаторных прокаспаз в т. н. инициаторных белковых комплексах. Все инициаторные каспазы содержат домен из суперсемейства домена смерти: DED или CARD. Благодаря наличию такого домена каспазы связываются в соответствующий инициаторный белковый комплекс. Прокаспазы-8 и -10 характеризуется наличием двух DED, следующих друг за другом, а про-каспазы-1, -2, -4, -5, -9, -11 и -12 содержат CARD домен (рис. 3). Именно за счет гомотипических взаимодействий между CARD или DED доменами прокаспазы связываются в инициаторные комплексы, в которых происходит их активация.

Прокаспазы-8 активируется в комплексе DISC [13]. Установлено, что в комплексе DISC присутствуют две изоформы прокаспазы-8 (прокаспазы-8a и прокаспазы-8b) [14]. Эти две



**Рис. 2.** Схема активации прокаспазы. Расщепление прокаспазы после остатков аспартата приводит к образованию активной каспазы, представляющей гетеротетрамер p10<sub>2</sub>-p20<sub>2</sub>. Показаны остатки, участвующие в формировании активного центра

изоформы очень близки по структуре: оба белка содержат два следующих друг за другом DED домена, а также каталитические субъединицы p18 и p10 (рис. 4). Прокаспаза-8а содержит дополнительный фрагмент (2 кДа (15 а.о.)), который образуется в результате трансляции экзона 9. Данный фрагмент располагается между вторым DED и большой субъединицей. Две изоформы отличаются на 2 кДа по молекулярному весу: прокаспаза-8а – это приблизительно 55 кДа (p55), а прокаспаза-8b – это 53 кДа (p53). Показано, что для активации прокаспазы-8 необходима пространственная сближенность и определенная взаимная ориентация между молекулами прокаспазы-8 в комплексе DISC, что способствует аутокаталитической активации прокаспазы-8 [15]. При этом комплекс DISC служит своеобразной платформой, которая позволяет создать условия для пространственной сближенности для молекул прокаспазы-8. Данная модель активации прокаспазы-8 получила название «индуцированной близости». Ряд экспериментальных данных показывает необходимость олигомеризации прокаспазы-8 для активации в рецепторном комплексе, что подтверждает модель «индуцированной близости». [16]. Более того, было показано, что активация прокаспазы-8 происходит при образовании димеров, состоящих из двух молекул прокаспазы-8 [17]. Расщепление прокаспазы-8 в комплексе DISC происходит в два этапа (рис. 4) [14, 18]. На первом этапе, расщепление после аспартата (положение 374) приводит к образованию двух продуктов расщепления: p43/p41 и p18/p10. На втором этапе расщепление происходит по позициям 216 и 384, что приводит к появлению продомена p26/p24, большой p18 и малой субъединицы p10. В результате образуется активный гетеротетрамер каспазы-8, p10<sub>2</sub>-p18<sub>2</sub>, который и запускает апоптоз [19].

### C-FLIP-АНТИ-АПОПТОТИЧЕСКИЙ БЕЛОК КОМПЛЕКСА DISC: ИНГИБИТОР ПРОКАСПАЗЫ-8

Белок c-FLIP (cellular FLICE inhibitory proteins, клеточные белки-ингибиторы FLICE), известный также как FLAME-1/I-FLICE/CASPER/CASH/MRIT/CLARP/Usurpin,

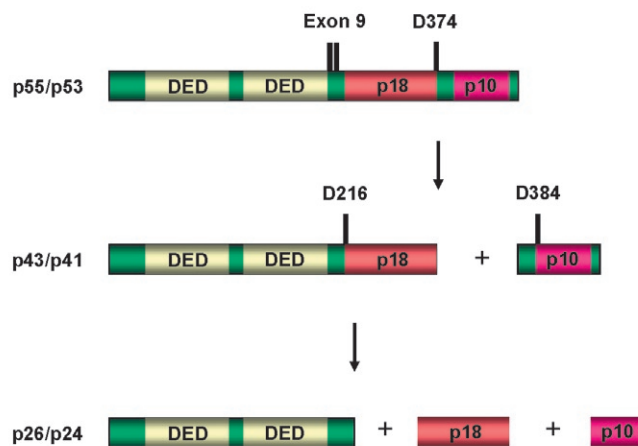


Рис. 4. Схема двух этапов протеолиза прокаспазы-8. Прокаспазы-8а/б показана зеленым, эффекторный домен смерти (DED) показан светло-желтым

является ингибитором апоптоза, запускаемого через рецепторы смерти [9, 20–24]. К настоящему моменту известно пять белков c-FLIP (рис. 5): три изоформы и два продукта расщепления. Три изоформы c-FLIP включают: c-FLIP<sub>Long</sub> (L, long, длинная), c-FLIP<sub>Short</sub> (S, short, короткая) и c-FLIP<sub>Raji</sub> (Raji, раджи) (рис. 5). Все три изоформы содержат эффекторный домен смерти, DED, за счет которого они связываются в комплексе DISC. При этом короткие изоформы c-FLIP<sub>S</sub> и c-FLIP<sub>R</sub> ингибируют активацию прокаспазы-8 в комплексе DISC, что приводит к ингибированию апоптоза. Длинная изоформа c-FLIP<sub>L</sub> способна играть как про-, так и антиапоптотическую функцию в комплексе DISC. При низких концентрациях c-FLIP<sub>L</sub> катализирует активацию прокаспазы-8, исполняя, таким образом, проапоптотическую роль, а при высоких концентрациях блокирует апоптоз, как и антиапоптотические белки c-FLIP<sub>S</sub> и c-FLIP<sub>R</sub> [25, 26]. Проапоптотическая роль c-FLIP<sub>L</sub> согласуется с данными, полученными при исследовании мышей с применением технологии генетического нокаута, которые показали, что мыши в отсутствие гена c-FLIP погибают через 11 дней эмбрионального развития [27].

Также было охарактеризовано два продукта расщепления белков c-FLIP: p43-FLIP и p22-FLIP [9, 24]. Показано, что p43-FLIP является продуктом протеолитического расщепления изоформы c-FLIP<sub>L</sub>. Образование p43-FLIP происходит в комплексе DISC в результате каталитического расщепления прокаспазы-8 по остатку аспартата 376 белка c-FLIP<sub>L</sub>. Показано, что p22-FLIP является продуктом протеолитического расщепления всех трех изоформ: c-FLIP<sub>L</sub>, c-FLIP<sub>S</sub> и c-FLIP<sub>R</sub> по остатку аспартата 196. p22-FLIP образуется в цитозоле при действии прокаспазы-8, независимо от индукции рецепторов смерти и образования комплекса DISC. Кроме того, было установлено, что p22-FLIP способен активировать фактор транскрипции NF-κB, который, в свою очередь, регулирует транскрипцию ряда анти-апоптотических генов, ингибирующих апоптоз. Активация происходит на уровне ИКК комплекса при связывании p22-FLIP с комплексом ИКК, при этом детальный механизм действия белка p22-FLIP в комплексе ИКК пока является объектом исследований.

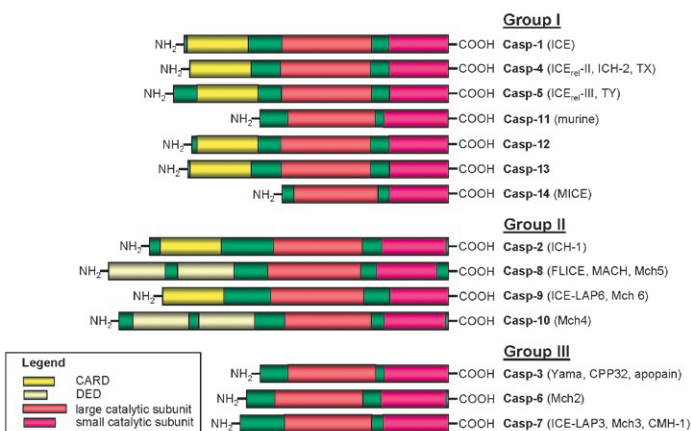
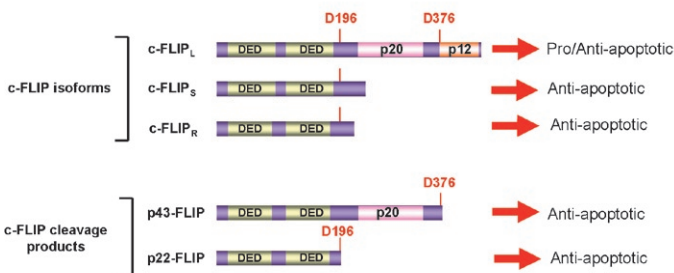


Рис. 3. Три группы каспаз. Группа I: каспазы, инициирующие процессы вос- паления. Группа II: каспазы, инициирующие апоптоз. Группа III: эффекторные каспазы. Показаны: эффекторный домен смерти (DED), домен активации и рекрутирования каспазы (CARD), а также большая субъединица (p20) и малая субъединица (p10)

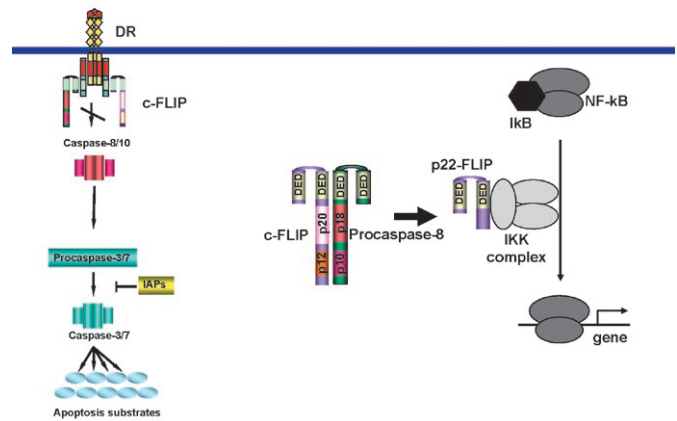
**DED-СОДЕРЖАЩИЕ БЕЛКИ КАК РЕГУЛЯТОРЫ ЖИЗНИ И СМЕРТИ**

DED-содержащие белки прокаспазы-8 и с-FLIP регулируют инициацию апоптоза, а также NF-κB [6]. В комплексе DISC, образованном на клеточной мембране, взаимодействия между DED-содержащими белками регулируют инициацию апоптоза: прокаспазы-8 активируются и запускают апоптоз. Белки с-FLIP блокируют активацию прокаспазы-8 и тем самым ингибируют апоптоз (рис. 6, левая часть). Единственное исключение составляет длинная изоформа с-FLIP<sub>L</sub>, которая, как уже упоминалось, может инициировать апоптоз в малых концентрациях. Таким образом, в комплексе DISC белок прокаспазы-8 имеет проапоптотическую функцию, а белок с-FLIP – антиапоптотическую.

В цитозоле, интересным образом, взаимодействия между DED-содержащими белками регулируют инициацию другого сигнального пути, а именно, NF-κB. При этом, в отличие от комплекса DISC, в цитозоле прокаспазы-8 обладает антиапоптотической функцией. Как же это происходит? Недавно было установлено, что прокаспазы-8 в цитозоле даже в отсутствие сигнала апоптоза расщепляет с-FLIP до фрагмента p22-FLIP, который, как было упомянуто выше, способен индуцировать NF-κB (рис. 6, правая часть). Прокаспазы-8 при этом не подвергается процессингу, который происходит в комплексе DISC, а использует свою т. н. прокаспазную, или проэнзиматическую, активность, которая отличается от каталитической активности активного гетеротетрамера активной каспазы. Вероятно, что расщепление с-FLIP до фрагмента p22-FLIP происходит при образовании гетеродимерного комплекса



**Рис. 5.** Схема белков с-FLIP. Показаны три изоформы белка с-FLIP и два продукта расщепления. Эффекторный домен смерти (DED) показан желтым. Остатки аспартата, расщепление по которым приводит к образованию p43-FLIP и p22-FLIP, выделены красным цветом



**Рис. 6.** DED-содержащие белки прокаспазы-8 и с-FLIP в цитозоле и в комплексе DISC. с-FLIP блокирует активацию прокаспазы в комплексе DISC (правая сторона). В цитозоле происходит образование гетеродимерного комплекса между белками: прокаспазы-8 и с-FLIP (левая сторона) приводящее к образованию p22-FLIP, который, в свою очередь, активирует фактор транскрипции NF-κB, который активирует транскрипцию ряда антиапоптотических генов, ингибирующих апоптоз

между белками: прокаспазы-8 и с-FLIP. При этом уровни экспрессии в клетке белков прокаспазы-8 и с-FLIP определяет количество фрагмента p22-FLIP и, соответственно, уровень индукции NF-κB, который, в свою очередь, регулирует транскрипцию ряда антиапоптотических генов, ингибирующих апоптоз.

Таким образом, соотношения между DED-содержащими белками в клетке являются ключевым фактором определяющим уровень устойчивости к апоптозу, и, таким образом, баланс между «жизнью» и «смертью». При этом важное значение для принятия этого решения между «жизнью» и «смертью» имеет внутриклеточная локализация DED-содержащих белков. В комплексе DISC прокаспазы-8 имеет только проапоптотическую функцию, а белок с-FLIP ингибирует ее активацию, в то время как в цитозоле белок с-FLIP, используя каталитическую активность прокаспазы-8, расщепляется до фрагмента p22-FLIP и активирует NF-κB (рис. 6). Таким образом, в цитозоле оба белка прокаспазы-8 и с-FLIP имеют антиапоптотическую активность. Дальнейшее изучение различных взаимодействий между DED-содержащими белками в цитозоле и в комплексе DISC, приводящих к индукции различных сигнальных путей, является задачей будущих исследований. ●

**Список литературы**

- Krammer, P. H. (2000) *Nature* **407**, 789-95
- Tartaglia, L. A., Ayres, T. M., Wong, G. H., and Goeddel, D. V. (1993) *Cell* **74**, 845-853
- Weber, C. H. and Vincenz, C. (2001) *Trends Biochem Sci* **26**, 475-81
- Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P., and Nagata, S. (1993) *Cell* **75**, 1169-78
- Trauth, B. C., Klas, C., Peters, A. M., Matzku, S., Moller, P., Falk, W., Debatin, K. M., and Krammer, P. H. (1989) *Science* **245**, 301-5
- Krammer, P. H., Arnold, R., and Lavrik, I. N. (2007) *Nat.Rev.Immunol.* **7**, 532-542
- Muzio, M., Chinnaiyan, A. M., Kischkel, F. C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J. D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P. H., Peter, M. E., and Dixit, V. M. (1996) *Cell* **85**, 817-27
- Sprick, M., Rieser, E., Stahl, H., Grosse-Wilde, A., Weigand, M., and Walczak, H. (2002) *Embo J* **21**, 4520-4530
- Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1999) *J Biol Chem* **274**, 1541-8
- Salvesen, G. S. (2002) *Cell Death Differ* **9**, 3-5
- Fuentes-Prior, P. and Salvesen, G. S. (2004) *Biochem.J.* **384**, 201-232
- Nicholson, D. W. (1999) *Cell Death and Differentiation* **6**, 1028-1042
- Medema, J. P., Scaffidi, C., Kischkel, F. C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1997) *Embo J* **16**, 2794-804
- Scaffidi, C., Medema, J. P., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1997) *J Biol Chem* **272**, 26953-8
- Salvesen, G. S. and Dixit, V. M. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 10964-7
- Boatright, K. M., Renatus, M., Scott, F. L., Sperandio, S., Shin, H., Pedersen, I. M., Ricci, J.

- E., Edris, W. A., Sutherlin, D. P., Green, D. R., and Salvesen, G. S. (2003) *Mol Cell* **11**, 529-41
- Chang, D. W., Xing, Z., Capacio, V. L., Peter, M. E., and Yang, X. (2003) *Embo J* **22**, 4132-42
- Golks, A., Brenner, D., Schmitz, I., Watzl, C., Krueger, A., Krammer, P. H., and Lavrik, I. N. (2006) *Cell Death Differ.* **13**, 489-498
- Lavrik, I., Krueger, A., Schmitz, I., Baumann, S., Weyd, H., Krammer, P. H., and Kirchhoff, S. (2003) *Cell Death Differ* **10**, 144-5
- Thome, M., Schneider, P., Hofmann, K., Fickenscher, H., Meinel, E., Neipel, F., Mattmann, C., Burns, K., Bodmer, J. L., Schroter, M., Scaffidi, C., Krammer, P. H., Peter, M. E., and Tschopp, J. (1997) *Nature* **386**, 517-21
- Budd, R. C., Yeh, W. C., and Tschopp, J. (2006) *Nature Reviews Immunology* **6**, 196-204
- Krueger, A., Baumann, S., Krammer, P. H., and Kirchhoff, S. (2001) *Mol Cell Biol* **21**, 8247-54
- Golks, A., Brenner, D., Fritsch, C., Krammer, P. H., and Lavrik, I. N. (2005) *J.Biol. Chem.* **280**, 14507-14513
- Golks, A., Brenner, D., Krammer, P. H., and Lavrik, I. N. (2006) *Journal of Experimental Medicine* **203**, 1295-1305
- Chang, D. W., Xing, Z., Pan, Y., Algeciras-Schimmich, A., Barnhart, B. C., Yaish-Ohad, S., Peter, M. E., and Yang, X. (2002) *Embo J* **21**, 3704-3714
- Micheau, O., Thome, M., Schneider, P., Holler, N., Tschopp, J., Nicholson, D. W., Briand, C., and Grutter, M. G. (2002) *J Biol Chem* **277**, 45162-71
- Yeh, W. C., Itie, A., Elia, A. J., Ng, M., Shu, H. B., Wakeham, A., Mirtsos, C., Suzuki, N., Bonnard, M., Goeddel, D. V., and Mak, T. W. (2000) *Immunity* **12**, 633-42

УДК 577.123

# Анализ фрагментации основного белка миелина под действием протеасомы

А. В. Бачева<sup>1#</sup>, А. А. Белогуров<sup>2</sup>, Н. А. Пономаренко<sup>2</sup>, В. Д. Кнорре<sup>2</sup>, В. М. Говорун<sup>2</sup>,  
М. В. Серебрякова<sup>3</sup>, А. Г. Габиров<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Химический факультет Московского Государственного Университета имени М. В. Ломоносова, Москва

<sup>2</sup> Институт биоорганической химии им. академиком М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

<sup>3</sup> Протеомный центр РАМН, НИИ Физико-химической медицины Росздрава РФ

# e-mail: anbach@libro.genebee.msu.ru

**РЕФЕРАТ** Протеасома – это высокомолекулярный белковый комплекс, служащий для направленной деградации белков в эукариотических клетках. Одной из функций протеасом является генерация пептидов, которые затем экспонируются на клеточной мембране с помощью молекул комплексов гистосовместимости как первого, так и второго класса. Есть все основания полагать, что протеасома принимает непосредственное участие в процессе специфической деградации основного белка миелина (ОБМ), составляющего около 30 % всех белков миелиновой оболочки аксонов нейронов. Детали этого механизма остаются невыясненными. В представленной работе изучены особенности специфической деградации ОБМ протеасомой.

Нами было продемонстрировано, что основной белок миелина (не подвергавшийся убиквитинилированию) является хорошим субстратом как для 20S, так и для 26S протеасомы. Впервые были определены сайты протеолиза ОБМ протеасомой из мозга мышей линий Balb/C и SJL и показаны значительные различия в паттерне деградации данного нейроантигена, что может свидетельствовать о лучшей презентации фрагментов основного белка миелина на комплексах гистосовместимости в случае мышей, предрасположенных к развитию экспериментального аутоиммунного энцефаломиелимита.

## ВВЕДЕНИЕ

Рассеянный склероз (РС) – хроническое нейродегенеративное заболевание аутоиммунной природы – представляет собой острую медико-социальную проблему, поскольку, как правило, поражает лиц молодого и среднего возраста. Проблема лечения РС остается далекой от решения, на сегодняшний день существуют лекарственные препараты, способные в некоторой степени замедлить течение РС, но не излечивать от этой патологии. Деградация нервных волокон, происходящая при рассеянном склерозе, протекает вследствие разрушения миелиновой оболочки нейронов. Одной из биохимических характеристик, которая отличает миелин от других биологических мембран, является высокое соотношение липид/белок. Белки составляют от 25 до 30 % массы сухого вещества миелиновой оболочки. Около 30 % всех белков миелина составляют три изоформы т. н. основного белка миелина (ОБМ). ОБМ является одним из основных аутоантигенов при РС. Ранее нами и другими исследователями было показано, что в деградации ОБМ могут принимать участие каталитические антитела [1-5], а также некоторые проте-

азы [6-9]. Известно, что в любой эукариотической клетке существует специализированная органелла для направленной деградации белков – протеасома, представляющая собой высокомолекулярный белковый комплекс. Одной из функций протеасом является генерация пептидов, которые затем экспонируются на клеточной мембране с помощью молекул комплексов гистосовместимости (МНС) как первого, так и второго класса [10]. Есть все основания полагать, что протеасома принимает непосредственное участие в процессе специфической деградации ОБМ. Детали этого механизма остаются невыясненными. В представленной работе нами были изучены особенности специфической деградации ОБМ протеасомой.

Известно, что 20S протеасома (мультикатализический протеиназный комплекс) – это олигомерная высокомолекулярная (700 кДа) протеиназа, которая может быть выделена индивидуально. Данный комплекс также является каталитическим ядром 26S протеасомы, в составе которой присутствуют одна или две регуляторных 19S субъединицы. Было показано, что и 20S и 26S протеасомы способны деградировать ОБМ [11, 12]. Вопрос о сайт-специфичности

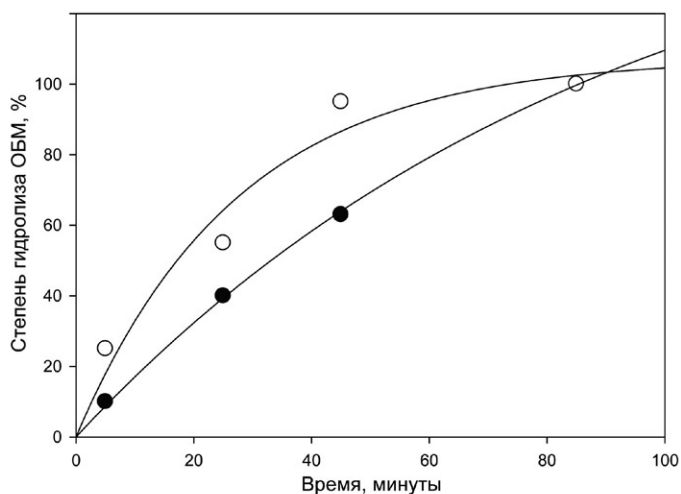


Рис. 1. Зависимость степени гидролиза ОБМ протеасомой от времени. Обозначения: о – 20S протеосома, • – 26S протеосома, выделенные из печени аутобредных мышей

деградации ОБМ протеасомой оставался открытым. Кроме того, известно, что при многих воспалительных патологических процессах протеазный комплекс (конститутивная протеосома) переходит в форму иммунопротеасомы, обладающей альтернативной специфичностью и каталитической эффективностью по отношению к процессингу внутриклеточных белков. Скорее всего, это «переключение» имеет непосредственное отношение к различной презентации антигенов в норме и патологии. Паттерн деградации ОБМ иммунопротеасомой до настоящего времени изучен не был.

**ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Протеосома была выделена и очищена по методу, описанному в [13]. Сначала была исследована деградация ОБМ (изоформа с молекулярной массой 18.5 кДа из мозга быка) полным 26S комплексом и каталитической 20S субъединицей, выделенными из печени аутобредных мышей. Как показано на рис. 1, инкубация ОБМ как с 20S, так и с 26S протеасомой приводила к постепенной деградации ОБМ. Уже через 45 мин 20S протеосома полностью гидролизовала основной белок миеллина, в то время как 26S протеасоме на это требовалось 85 мин. Такое различие в скоростях можно отнести к разному количеству протеасомы: в случае 20S протеасомы соотношение фермент/субстрат составило 2.7/1 (по белку, мкг/мкг) или 1/14.5 (моль/моль), а в случае 26S соотношение фермент/субстрат составило 1/1 (по белку, мкг/мкг) или 1/110 (моль/моль). Количество протеасомы оценивали по методу Лоури, используя бычий сывороточный альбумин в качестве стандарта.

Гидролизаты ОБМ, полученные под действием 20S и 26S комплексов из печени аутобредных мышей, были разделены на фракции методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке C4 (Waters, DeltaPak, 300 Å). Наблюдаются некоторые отличия в профилях элюции, в частности, в некоторых пиках, совпадающих для 20S и 26S протеасом, содержится разное количество вещества, кроме того, при гидролизе 26S протеасомой появляются новые фракции. Таким образом,

паттерн деградации ОБМ 26S протеасомой несколько изменен по сравнению с таковым для 20S протеасомы. Отмеченные различия можно объяснить разной доступностью для протеолиза участков ОБМ, находящихся на поверхности белковой глобулы и в глубине молекулы, а также имеющими выраженную вторичную структуру. Для 26S протеасомы доступность разных участков ОБМ не имеет большого значения, поскольку в составе 19S субъединицы есть субъединицы, отвечающие за денатурацию молекул белка, которые будут подвергнуты деградации.

Пул протеасом неоднороден и состоит из макромолекулярных комплексов нескольких типов, причем каталитические субъединицы могут относиться к т. н. конститутивным ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$  и  $\beta 5$ ) или иммунным ( $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  и  $\beta 5i$ ) (рис. 2). Шесть каталитических субъединиц протеасомы обладают тремя типами активности, а именно: химотрипсिनоподобной (гидролиз после гидрофобных и ароматических аминокислот Leu, Tug, Phe), трипсиноподобной (гидролиз после положительно заряженных Lys и Arg) и каспазоподобной (гидролиз после отрицательно заряженных Asp и Glu) [14].

Соотношение конститутивная протеосома/иммунопротеосома имеет ярко выраженную тканеспецифичность и в значительной степени зависит от иммунного статуса организма. Так, например, в головном мозге в норме более 90 % протеасом – конститутивные, а в селезенке около 90-95 % протеасом являются иммунопротеасомами. Кроме того, в любых тканях под действием гамма-интерферона интенсивно нарабатываются иммуносубъединицы, которые встраиваются во вновь собранные мультикаталитические комплексы [15]. Ранее было показано, что замены каталитических субъединиц на иммунные приводят к изменению специфичности гидролиза и увеличению его скорости. Иммунопротеосома практически теряет способность

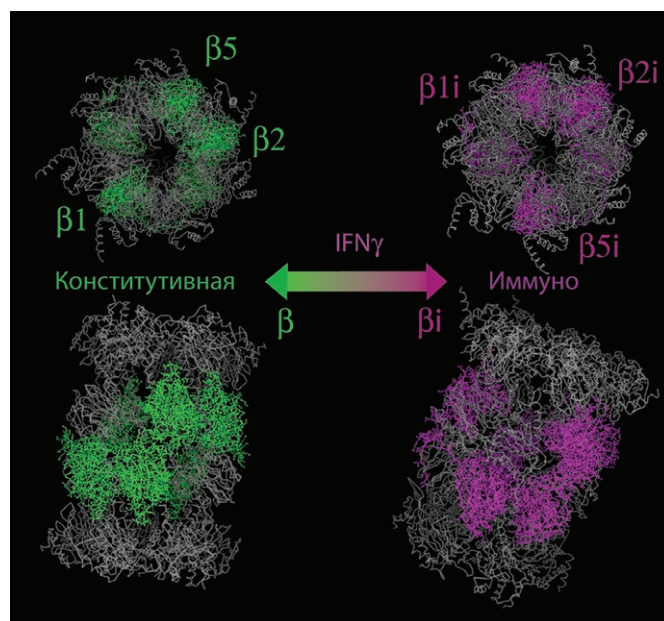
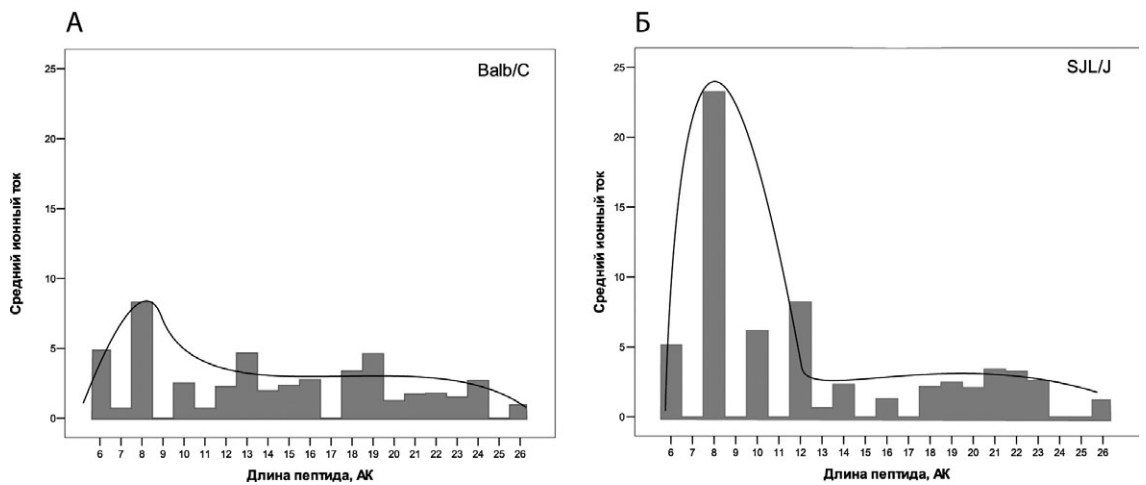


Рис. 2. Равновесие протеосома – иммунопротеосома. Иммунные каталитические субъединицы нарабатываются под действием гамма-интерферона



Рис. 3. Аминокислотная последовательность ОБМ. Стрелками указаны протеолитические пептиды, определенные с помощью хромото-масс-спектрометрии в гидролизатах ОБМ протеасомой из мозга мышей линии SJL/J (верхняя часть рисунка) и Balb/C (нижняя часть рисунка). Толщина стрелок обозначает частоту встречаемости соответствующего пептида. Цветными прямоугольниками выделены иммунодоминантные районы ОБМ

Рис. 4. Распределение по длинам пептидов, обнаруженных в гидролизатах ОБМ пулами протеасом из мозга мышей линии а) Balb/C б) SJL/J. Столбиками на диаграмме представлены экспериментальные значения ионного тока для пептидов данной длины, полученные методом LC-MS масс-спектрометрии



гидролизовать пептидные связи после остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот (каспазоподобная активность), зато значительно чаще происходит гидролиз после гидрофобных и особенно разветвленных гидрофобных аминокислотных остатков. Таким образом, под действием иммунопротеасомы получается большее количество пептидов, несущих гидрофобные аминокислоты на С-конце. Поскольку С-концевые гидрофобные аминокислоты являются важными якорными фрагментами для связывания с молекулами I класса главного комплекса гистосовместимости, следовательно, изменение в специфичности гидролиза приводит к увеличению выработки пептидов, образующих комплексы с молекулами МНС. Фрагменты, связанные с молекулами МНС, презентуются на внешней мембране клеткам иммунной системы. Таким образом, клетки, содержащие иммунопротеасому, будут более эффективно презентировать свои антигены.

Кроме того, известно, что альфа-субъединицы каталитической 20S субчастицы протеасомы действуют как ворота, формируя аксиальный канал, регулирующий вход и выход белков и продуктов их деградации. Закрытие канала может, таким образом, способствовать более полной деградации субстратов, поскольку препятствует выходу

частично гидролизованых полипептидов [16]. Было также продемонстрировано [17], что открывание канала сильно влияет на кинетику протеолиза и распределение по длине гидролитических фрагментов, полученных *in vitro*. Если канал открыт, то скорость гидролиза увеличивается, но при этом средняя длина получающихся фрагментов также увеличивается на 40%. Таким образом, более высокая скорость работы иммунопротеасомы должна приводить к более длинным пептидам – продуктам деградации, которые будут лучше связываться с молекулами МНС и, следовательно, более эффективно представляться на поверхности клетки.

Известно, что мыши линии SJL генетически предрасположены к развитию экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита. Данная патология является животной моделью рассеянного склероза. С помощью иммуноблоттинга мы изучили состав пула протеасом в головном мозге мышей этой линии и показали, что содержание иммунопротеасом повышено по сравнению с мышами линии Balb/C (данные не приведены). Поэтому на следующем этапе из мозга мышей линии Balb/C и линии SJL была выделена 26S протеасома и изучен протеолиз ОБМ этими образцами протеасом.

Гидролизаты ОБМ, полученные под действием протеасом,



выделенных из мозга мышей этих двух линий, были исследованы методом LC-MS (высокоэффективная жидкостная хроматография с детекцией методом масс-спектрометрии). На рис. 3 приведена последовательность основного белка миеллина с указанием мажорных фрагментов, продуцируемых пулами протеасом из разных источников. Толщина соответствующих стрелок демонстрирует относительное количество пептида в гидролизате при анализе.

В аминокислотной последовательности ОБМ выделяют следующие области, соответствующие иммунодоминантным районам белка: 12-31, 82-98, 110-128 и 144-169, причем фрагмент 85-98 представляет собой т.н. энцефалитогенный эпитоп.

Необходимо отметить, что деградация ОБМ протеасомой из печени аутобредных мышей, как полным комплексом, так и каталитической частью, не приводила к выщеплению иммуногенных пептидов, все они подвергались дальнейшей фрагментации внутри каталитической камеры протеасомы.

В гидролизате ОБМ протеасомой из мозга мышей обеих линий практически единственным сайтом гидролиза, где протеасома проявляла свою каспазоподобную активность, была связь между аминокислотными остатками Asp81-Glu82, близкая к началу энцефалитогенного пептида.

Характер гидролиза ОБМ протеасомами, выделенными из головного мозга мышей линии SJL и Balb/C, был различен. У мышей аутоиммунной линии генерируемые эпитопы существенно лучше колокализуются с иммунодоминантными фрагментами белка. При действии данного пула на ОБМ содержание фрагмента энцефалитогенного пептида составляет до четверти всех получаемых фрагментов гидролиза. У мышей стандартной линии Balb/C – в два раза меньше. Кроме того, полученные фрагменты существенно хуже соотносятся с областями узнавания комплексов гистосовместимости второго класса.

На рис. 4 представлено распределение по длинам пептидов в соответствующих гидролизатах. По оси ординат представлены экспериментальные значения ионного тока для пептидов данной длины, полученные методом LC-MS. Из рисунка видно, что максимум распределения приходится на пептиды длиной 8 аминокислот в случае протеасом из головного мозга мышей как линии SJL, так и Balb/C. Однако относительное значение среднего ионного тока в мак-

симуме сильно различается, что свидетельствует о существенно большем количестве фрагментов данной длины в случае мышей аутоиммунной линии. В гидролизатах преобладают пептиды с четным числом аминокислотных остатков, ни в одном из них не было обнаружено пептидов короче четырех аминокислотных остатков. Эти данные согласуются с описанными в литературе [18], а также с тем, что одной из главных ролей протеасомы в клетке является генерация пептидов для последующей презентации на молекулах МНС I класса, на которые могут загружаться пептиды длиной до 10 аминокислотных остатков. Присутствующие в гидролизатах более длинные пептиды могут затем расщепляться до фрагментов меньшей длины и представляться на молекулах МНС I класса, а также участвовать в презентации на молекулах МНС II класса [10].

## ВЫВОДЫ

Таким образом, в настоящей работе показано, что 20S и 26S протеасомы способны гидролизовать основной белок миеллина, при этом молярное соотношение протеасома/ОБМ составило 1/14.5 для 20S и 1/110 для 26S, время полного гидролиза 45 мин и 85 мин соответственно. После разделения гидролизатов методом LC-MS массы фрагментов были определены методом MALDI-масс-спектрометрии, и, после анализа аминокислотной последовательности ОБМ, идентифицированы сайты протеолиза.

Нами было продемонстрировано, что основной белок миеллина (не подвергавшийся убиквитинилированию) является хорошим субстратом как для 20S, так и для 26S протеасомы. Впервые были определены сайты протеолиза ОБМ протеасомой из мозга мышей линий Balb/C и SJL и показаны значительные различия в паттерне деградации данного нейроантигена, что может свидетельствовать о лучшей презентации фрагментов основного белка миеллина на комплексах гистосовместимости в случае мышей, предрасположенных к развитию экспериментального аутоиммунного энцефаломиелимита. ●

*Работа была поддержана грантами РФФИ 07-04-12100-офи, 09-04-01546-а, 07-04-92168-НЦНИ\_а, NATO SFPP 982833 и программой президиума РАН фундаментальные науки – медицине 2008 г.*

## Список литературы

1. Ponomarenko, N.A., Durova, O.M., Vorobiev, I.I., Aleksandrova, E.A., Telegin, G.B., Chamborant, O.A., Sidarik, L.L., Suchkov, S.V., Alekberova, Z.S., Gnuchev, N.V., Gabibov, A.G. // J. Immunol. Methods, 2002. V. 269, P. 197–211.
2. Ponomarenko, N. A., Durova, O. M., Vorobiev, I. I., Belogurov, A. A., Telegin, G. B., Suchkov, S. V., Kiselev, S. L., Lagarkova, M. A., Govorun, V. M., Serebryakova, M. V., Gabibov, A.G. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2006. V. 103, P. 281–286.
3. Belogurov, A. A. Jr., Kurkova, I.N., Friboulet, A., Thomas, D., Misikov, V.K., Zakharova, M.Y., Suchkov, S.V., Kotov, S.V., Alehin, A.I., Avalle, B., Souslova, E.A., Morse, H.C. 3rd., Gabibov, A.G., Ponomarenko, N.A. // J. Immunol., 2008. V. 180, P. 1258–1267.
4. Polosukhina, D. I., Kanyshkova, T. G., Doronin, B. M., Tyshkevich, O. B., Buneva, V. N., Boiko, A. N., Gusev E. I., Nevinsky, G. A., Favorova, O. O. // Immunol Lett., 2006. V. 103, P. 75–81.
5. Белогуров, А. А., Куркова, И. Н., Мисиков, В. К., Сучков, С. В., Телегин, Г. Б., Алехин, А. И., Гончаров, Н. Г., Кнорре, В. Д., Габибов, А. Г., Пономаренко, Н. А. // Доклады Академии Наук, 2007. Т. 413, С. 408–411.
6. Pritzker, L. B., Joshi, S., Gowan, J. J., Harauz, G., Moscarello, M. A. // Biochemistry, 2000. V. 39, P. 5374–5381.
7. Schaefer, K. E., Shields, D. C., Banik, N. L. // Neurochemical Research, 2001. V. 26, P. 731–737.
8. Medveczky, P., Antal, J., Patthy, A., Kékési, K., Juhász, G., Szilágyi, L., Gráf, L. // FEBS Lett. 2006. V. 580, P. 545–552.
9. D'Souza, C. A., Moscarello, M. A. // Neurochem Res. 2006. V. 31, P. 1045–1054.
10. Tewari, M. K., Sinnathamby, G., Rajagopal, D., Eisenlohr L. C. // Nature Imm, 2005. V. 6, N. 3, P. 287–294.
11. Lucas, J., Lobo, D., Terry, E., Hogan, E. L., Banik N. L. // Neurochem. Res., 1992. V. 17, P. 1261–1266.
12. Akaishi, T., Shiomi, T., Sawada, H., Yokosawa, H. // Brain Research, 1996. V. 722, P. 139–144.
13. Абрамова, Е. Б., Астахова, Т. М., Ерохов, П. А., Шарова, Н. П. // Известия РАН, серия биологическая, 2004. Т. 2, С. 150–156.
14. Orłowski, M., Cardozo, C., Michaud, C. // Biochemistry, 1993. V. 32, P. 1563–1572.
15. Namiki, S., Nakamura, T., Oshima, S., Yamazaki, M., Sekine, Y., Tsuchiya, K., Okamoto, R., Kanai, T., Watanabe, M. // FEBS Lett, 2005. V. 579, P. 2781–2787.
16. Kisselev, A. F., Kaganovich, D., Goldberg, A. L. // J. Biol. Chem., 2002. V. 277, P. 22260–22270.
17. Kohler, A., Cascio, P., Leggett, D. S., Woo, K. M., Goldberg, A. L., Finley, D. // Mol. Cell., 2001. V. 7, P. 1143–1152.
18. Mishto, M., Luciani, F., Holzhütter, H.G., Bellavista, E., Santoro, A., Textoris-Taube, K., Franceschi, C., Kloetzel, P.M., Zaikin, A. // J. Biol. Chem., 2008. V. 377, P. 1607–1617.

УДК 577.214.3

# Взаимодействие РНК-зависимой РНК-полимеразы вируса гепатита С с РНК-матрицами

К. А. Кондукторов, Г. С. Людва, А. В. Иванов, В. Л. Туницкая, С. Н. Кочетков#  
 Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН,  
 # e-mail: kochet@eimb.ru

Гепатит С является одним из наиболее опасных и широко распространенных вирусных заболеваний. В настоящее время, по оценкам ВОЗ, вирусом гепатита С (ВГС) – этиологическим агентом инфекции, поражено около 170 млн человек практически во всех странах мира. Ключевым ферментом, осуществляющим репликацию генома ВГС, является РНК-зависимая РНК-полимераза (Р-РНКП, неструктурный вирусный белок NS5B). Р-РНКП имеет молекулярную массу ~67 кДа и локализуется на мембране эндоплазматического ретикулаuma пораженной клетки печени посредством С-концевого  $\alpha$ -спирального трансмембранного домена (21 а.о.). Одним из характерных свойств Р-РНКП является ее способность катализировать синтез РНК как по праймер-зависимому, так и по праймер-независимому (de novo) механизмам [1]. В первом случае в опытах in vitro в качестве РНК-матрицы, как правило, используется праймер-матричный дуплекс поли(гА)-олиго(гU), а во втором – фрагменты генома ВГС. Предполагается, что в репликации принимает участие олигомер из нескольких одинаковых молекул Р-РНКП, причем установлено, что в его образовании участвуют аминокислотные остатки H502 и E18, расположенные в области взаимодействия белковых глобул [2].

Ранее нами был получен штамм *E. coli* – продуцент Р-РНКП ВГС, позволяющий получить высокоочищенный рекомбинантный белок с выходом до 6 мг/л культуры, и разработана процедура очистки фермента до состояния, близкого к гомогенному (по данным электрофореза в полиакриламидном геле) [3]. Процедура очистки включала приемы, сходные с описанными в литературе [4]; определенные ки-

нетические параметры праймер-зависимой реакции для полученного препарата полимеразы также соответствовали литературным данным [5]. Однако при переходе к праймер-независимой репликации гетерогенных РНК (например, к матрице (-)IRES, представляющей собой 3'-нетранслируемый регион (-)цепи вирусного генома ВГС) было отмечено аномально высокое включение радиоактивной метки. Фермент также оказался способен к одношаговой элонгации олигонуклеотидов в праймер-зависимой системе, что ограничивало его возможности в исследованиях специфических ингибиторов. Эти факты указывали на возможные примеси клеточных РНК в препарате белка, образующих прочный комплекс с молекулой фермента и способных служить «эндогенной» матрицей. Вследствие этого представилось необходимым как модифицировать метод очистки фермента, так и более тщательно подойти к определению параметров его взаимодействия с матрицами разных типов.

Р-РНКП ВГС экспрессировали в клетках *Escherichia coli*, используя плазмиду pET21-2c-5BΔ55, как описано ранее [3]. Исходно выделение белка, содержащего на С-конце полипептидной цепи шесть остатков гистидина, проводили разрушением клеток ультразвуком и хроматографией лизата, осветленного центрифугированием, на колонке с Ni-NTA-агарозой в градиенте концентраций имидазола. Активность фермента определяли на основании измерения включения радиоактивно-меченного [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-УТР в высокомолекулярные продукты при использовании поли(гА)-олиго(гU) праймер-матричного комплекса или (-)IRES матрицы. Полученный препарат Р-РНКП ВГС обладал высокой полимеразной активностью в праймер-зависимой системе ее определения.

При этом, при репликации РНК *de novo* наблюдалось высокое включение радиоактивной метки, как в присутствии, так и в отсутствие матрицы.

Модификация стандартного метода выделения заключалась в лизисе бактериальных клеток лизоцимом (1 мг/мл, Sigma, США) с последующим криолизом (2-3 цикла замораживания/оттаивания) в жидком азоте, после чего к лизату добавляли NH<sub>4</sub>Cl до концентрации 1 М. После полного растворения хлорида аммония добавляли 10 % раствор полиэтиленimina (Serva, ФРГ) до конечной концентрации 1 %, раствор перемешивали 30-40 мин при 4 °С, центрифугировали при 3-5000 об/мин в течение 3 мин и отбирали супернатант. К супернатанту добавляли сульфат аммония до 80 % насыщения и инкубировали при 4 °С в течение ночи. Белки осаждали центрифугированием при 10 000 об/мин при 4 °С в течение 20 мин, осадок растворяли в минимальном объеме буфера, содержащем 20 mM Трис-НСl pH 7.5, 350 mM NaCl, 5 % глицерина, 1 mM β-меркаптоэтанола, 1 mM фенилметилсульфонилфторида (PMSF), 1 мкл/мл смеси ингибиторов протеаз (Sigma, США). Проводили диализ в два этапа (по 1 ч каждый) против 500 мл того же буфера. Диализат дважды наносили на колонку с Ni-НТА агарозой, уравновешенной тем же буфером. Отмывку колонки проводили 50 mM имидазолом. Белок элюировали 200 mM имидазолом и собирали по фракциям. Элюат диализовали в два этапа против 200 и 100 мл буфера (первый буфер содержал Трис-НСl 20 mM pH 7.5, NaCl 350 mM, 10 % глицерина, 0.5 mM ЭДТА, 10 mM β-меркаптоэтанола; состав второго буфера тот же, кроме 50 % глицерина) соответственно. Концентрацию белка измеряли по методу Бредфорд [6].

Общую и удельную активности фермента определяли по методу, описанному нами ранее [3].

Фосфорилирование РНК и препаратов Р-РНКП проводили при помощи Т4-полинуклеотидкиназы (Fermentas, Литва) и [γ<sup>32</sup>P]-АТФ согласно инструкции производителя. Фосфорилированную РНК очищали на микроколонках Micro-spin G-50 (GE Healthcare, США).

Кинетические параметры взаимодействия фермента с РНК определяли при помощи дот-блот гибридизации. Использовали 48-луночный доттер с применением нитроцеллюлозной и нейлоновой мембран (Bio-Rad, США). Нитроцеллюлозную мембрану помещали поверх нейлоновой

в доттере. Мембраны предварительно смачивали в буфере, содержащем 50 mM HEPES-KOH pH 7.5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM β-меркаптоэтанола. Фермент разводили с шагом в два раза от верхнего значения концентрации при 500 mM NaCl. Связывание РНК проводили при 4 °С в течение 30 мин в буфере для смачивания мембран, после чего наносили на мембраны. Концентрацию РНК определяли опытным путем и довели до 2 nM. Высушенные мембраны экспонировались течение 40-60 мин и визуализировались при помощи Storage Phosphor Screen и Phosphor Imager (Packard, США). Математическую обработку результатов проводили с применением программ Total Lab и Origin 7.0.

Необходимость внесения изменений в методику очистки Р-РНКП была связана с возможным наличием в очищенном препарате рекомбинантного фермента коротких примесных РНК, возможно, относящихся к бактериальным рибосомальным или транспортным РНК. Эти примесные РНК могли бы конкурентно блокировать центры связывания нуклеиновых кислот в молекуле фермента и, таким образом, препятствовать взаимодействию *in vitro* с РНК-матрицами, добавляемыми в реакцию. Как известно, при обработке бактериальных клеток ультразвуком происходит механическое разрушение клеточных нуклеиновых кислот, которые дробятся на мелкие фрагменты различной длины. В данном случае часть из них, по-видимому, связывалась с рекомбинантной Р-РНКП, причем этот процесс протекал с высокой аффинностью, что препятствовало их отделению на дальнейших этапах очистки. Действительно, в результате обработки препаратов фермента [γ<sup>32</sup>P]-АТФ в присутствии полинуклеотидкиназы, осуществляющей, как известно, специфичное фосфорилирование свободного 5'-конца полинуклеотида, было выявлено наличие как минимум трех дискретных низкомолекулярных РНК, длины которых лежали в диапазоне от 12 до 60 нуклеотидов (рис. 1а и б). Кроме того, было показано образование комплекса белок-РНК в экспериментах по ковалентному сшиванию компонентов комплекса формальдегидом (рис. 1в). Попытки избавиться от данных примесей с использованием различных приемов, в частности, обработки высокими концентрациями NaCl (до 1.5 М) и дополнительной хроматографии на гепарин-агарозе, успеха не имели (данные не представлены).

В результате предложенный ранее метод выделения Р-РНКП был модифицирован таким образом, чтобы препа-

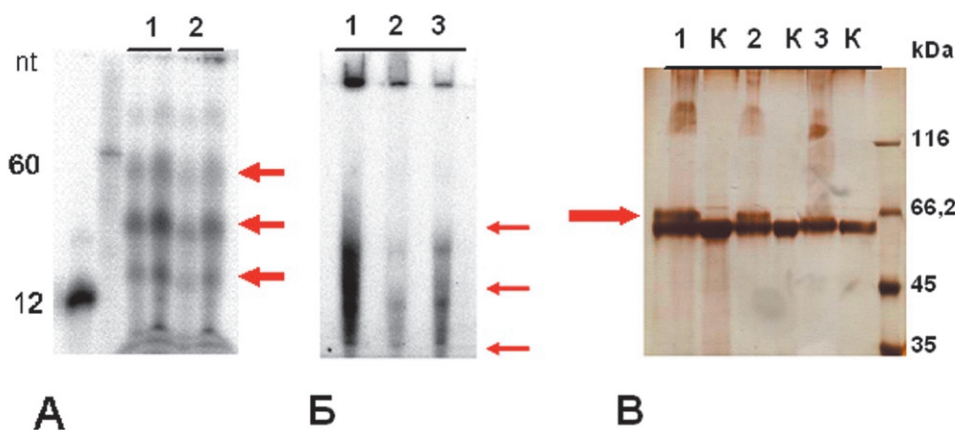


Рис. 1. Низкомолекулярные РНК в препаратах Р-РНКП, выделенных стандартным методом, выявленные фосфорилированием препаратов [γ<sup>32</sup>P]-АТФ (дорожка 1 – дикий тип, 2 – двойной мутант) (а); значительно меньшее количество примесных РНК в препарате Р-РНКП дикого типа, выделенного модифицированным методом, выявлено фосфорилированием препаратов [γ<sup>32</sup>P]-АТФ (дорожка 1 – дикий тип старого выделения, 2 – дикий тип модифицированного выделения, 3 – двойной мутант старого выделения, К – отрицательный контроль без сшивки) (б); образование комплекса Р-РНКП старого выделения с примесной РНК, сшивки 1 % формальдегидом (дорожка 1 – дикий тип, 2 – мутант с одиночной заменой, 3 – двойной мутант) (в); а, б – радиоавтография, в – окраска серебром

рат активного фермента не содержал примесных РНК. Модификация заключалась в замене способа разрушения бактериальных клеток, тогда как последующие этапы очистки остались прежними. При использовании данного метода исключалась обработка клеток ультразвуком, приводящая к образованию коротких НК, а высокая концентрация соли приводила к диссоциации белково-нуклеиновых комплексов и препятствовала сосаждению целевого белка с нуклеиновыми кислотами. Такой подход ранее был с успехом применен нами при очистке рекомбинантной T7 РНК-полимеразы [7].

Поскольку вопрос об олигомеризации фермента при связывании РНК по-прежнему остается открытым, в эксперименте наряду с ферментом дикого типа мы использовали полученный нами двойной мутант (DM) Р-РНКП (H502L, E18A), который по литературным данным не способен к олигомеризации [2], а также две мутантные формы Р-РНКП с единичными точечными заменами близ активного центра (R222A и C223A), которые, предположительно, могли влиять на связывание фермента с РНК. Препараты Р-РНКП дикого типа, выделенные новым методом, отличались высокими значениями удельной активности (9.2 нмоль/мин · 1 мкг фермента). Согласно литературным данным [2], двойная аминокислотная замена (H502L, E18A) в Р-РНКП ВГС приводит к неактивности двойного мутанта. Однако наши данные показали, что удельная активность двойного мутанта несколько выше, чем у фермента дикого типа (20.4 нмоль/мин · 1 мкг фермента).

Следует отметить, однако, что использование нового метода приводило к уменьшению выхода целевого белка. Если при выделении стандартным методом выход Р-РНКП составлял 3-5 мг/л клеточной культуры, то при выделении новым методом выход не превышал 1 мг/л. Кроме того, как выяснилось, препараты Р-РНКП, не содержащие примесных полинуклеотидов, имеют гораздо меньшую стабильность. В отличие от стандартных препаратов, стабильных при температуре хранения -20 °С в течение одного года, новые препараты сохраняли свою активность максимум один месяц при температуре -85 °С (данные не представлены). Это явление объясняется возможным участием примесных полинуклеотидов в стабилизации фермента от инактивации.

Свободные от примесных полинуклеотидов препараты Р-РНКП обладали существенно более высоким средством

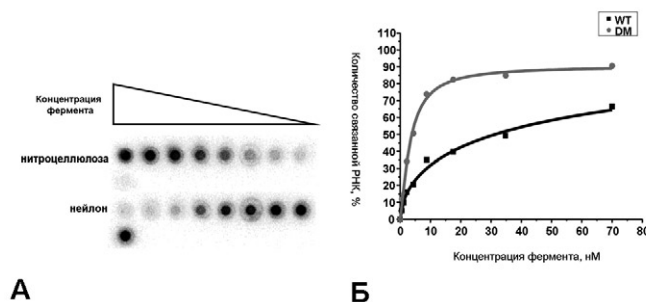


Рис. 2. Определение параметров связывания Р-РНКП с РНК. (А) дот-гибридизация на нитроцеллюлозной и нейлоновой мембранах; (Б) зависимость связывания РНК от концентрации фермента. Обозначения: WT – дикий тип, DM – двойной мутант

*in vitro* к РНК различной структуры. В экспериментах были использованы РНК трех типов – короткие (rA<sub>20</sub>) и длинные (поли-rA) гомополимеры, а также протяженная гетерополимерная РНК ВГС (-IRES). Рис. 2 и табл. 1 демонстрируют полученные результаты.

Параметры взаимодействия Р-РНКП с РНК обчисливались в соответствии с уравнением Хилла [8], поскольку предполагается, что связывание протяженных РНК происходит кооперативно [9]. Как следует из табл. 1, константы диссоциации для Р-РНКП WT и DM в случае (rA<sub>20</sub>) существенно различаются, т.е. олигомеризация Р-РНКП препятствует связыванию коротких РНК. В то же время при связывании протяженной гомополимерной матрицы оба фермента (WT и DM) ведут себя одинаково, и взаимодействие не кооперативно. На основании этих данных можно предположить, что, во-первых, сайт связывания матрицы не превышает 20 нуклеотидов и, во-вторых, при связывании протяженного полинуклеотида белком дикого типа структура олигомера меняется. В случае мутантов с одиночными заменами такой картины не наблюдалось, и оба белка показали сходные результаты.

Таким образом, нами был модифицирован метод получения Р-РНКП ВГС, позволивший получить рекомбинантный белок, свободный от примесных клеточных полинуклеотидов. Полученный препарат Р-РНКП обладал большим средством к различным РНК, что позволило уточнить параметры этого взаимодействия. ●

Табл. 1. Параметры связывания РНК ферментом, выделенным двумя способами. Обозначения: WT – дикий тип, DM – двойной мутант, n – коэффициент Хилла, K<sub>d</sub> – константа диссоциации комплекса

Тип РНК	Параметры	Стандартный метод		Модифицированный метод	
		WT	DM	WT	DM
rA <sub>20</sub>	K <sub>d</sub> (нМ)	57,86 ± 1,82	-	17,34 ± 6,62	2,73 ± 0,31
	n	0,59 ± 0,14	-	1,08 ± 0,21	1,38 ± 0,19
поли-rA	K <sub>d</sub> (нМ)	-	-	0,81 ± 0,12	1,03 ± 0,13
	n	-	-	0,97 ± 0,21	0,83 ± 0,12
(-)IRES	K <sub>d</sub> (нМ)	>3000	>3000	7,80 ± 1,21	14,69 ± 2,94
	n	-	-	1,24 ± 0,16	1,20 ± 0,18

Список литературы

- Bressanelli S, Tomei L, Roussel A, Incitti L, Vitale R.L., Mathieu M., De Francesco R., Rey F.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. P. 13034-13039
- Qin W, Luo H, Nomura T, Hayashi N, Yamashita T, Murakami S. // J Biol Chem. 2002. V. 277. № 3. P. 2132-2137.
- Ivanov A.V., Korovina A.N., Tunitskaya V.L., Kostyuk D.A., Rechinsky V.O., Kukhanova M.K., Kochetkov S.N. // Prot. Expr Purif. 2006. V. 48. № 1. P. 14-23.
- Hengen P. // Trends Biochem Sci. 1995. Jul;20(7):285-6.
- Zhong W, Ferrari E, Lesburg C.A., Maag D, Ghosh S.K., Cameron C.E., Lau J.Y., Hong Z. // J Virol. 2000. V. 74. P. 9134-9143.
- Bradford M.M. // 1976 May 7;72:248-54.
- Tunitskaya V.L., Akbarov A.Kh., Luchin S.V., Memelova L.V., Rechinsky V.O., Kochetkov S.N. // Eur J Biochem. 1990. V. 191. № 1. P. 99-103.
- Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г. Биокинетика М., «Гранд», 1998. 720 с.
- Wang Q.M., Hockman M.A., Staschke K., Johnson R.B., Case K.A., Lu J., Parsons S., Zhang F, Rathnachalam R., Kirkegaard K., Colacino J.M. // J Virol. 2002 Apr;76(8):3865-72.

УДК 577.2

# Изучение мембранной локализации в *E. coli* рекомбинантных калиевых каналов

О. В. Некрасова<sup>1#</sup>, А. И. Тагвей<sup>1</sup>, А. А. Игнатова<sup>1,2</sup>, А. В. Феофанов<sup>1,2</sup>, М. П. Кирпичников<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН

<sup>2</sup> Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова

# e-mail: genchem@ibch.ru

**РЕФЕРАТ** Осуществление эффективной экспрессии рекомбинантных мембранных белков в *E. coli* напрямую связано с совершенствованием подходов и методов, направленных на встраивание целевых белков в клеточную мембрану и образование ими правильной пространственной структуры. Важной технологической задачей в этом направлении является разработка методов изучения локализации целевых белков в клетке-хозяине. На модельной системе гибридного калиевого канала KcsA-Kv1.3 разработана технологическая схема изучения мембранной локализации в клетках *E. coli* рекомбинантных белков, содержащих функционально-активные участки вольт-зависимых эукариотических калиевых каналов. Схема включает применение биохимических и флуоресцентных методов детекции целевых белков в мембране, а также изучение их лиганд-связывающей активности в составе бактериальной мембраны.

**Ключевые слова:** мембранные белки; KcsA; фракционирование клеток; флуоресцентные методы

## ВВЕДЕНИЕ

Определение структуры и функций мембранных и мембранно-связанных белков является одним из актуальных направлений современной биологии. Мембранные белки участвуют в важнейших клеточных процессах – рецепции и межклеточной коммуникации, молекулярном и ионном транспорте, играют роль в патогенезе многих заболеваний и являются мишенями большей части фармацевтических препаратов [1].

В связи с низким уровнем биосинтеза многих мембранных белков в биологических тканях основным источником этих белков для структурно-функциональных исследований являются рекомбинантные молекулы, полученные в различных системах гетерологической экспрессии. [2]. Бактериальные клетки (в частности, *Escherichia coli*) представляют собой распространенную и наиболее продуктивную систему биосинтеза рекомбинантных мембранных белков [3]. Вместе с тем гетерологическая экспрессия в *E. coli* эукариотических белков, в т.ч. мембранных, приводит к возникновению ряда проблем, связанных с их общей токсичностью для клеток. Кроме того, распространенным случаем является экспрессия агрегированного белка в тельцах включения, что приводит к необходимости тщательного подбора условий его рефолдинга после выделения. Более перспективным представляется подход, основанный на экспрессии мембранных белков в составе бактериальной мембраны с образованием правильной пространственной укладки (фолдинга) белковой молекулы [4].

Реализация такого подхода может быть существенно облегчена, если обеспечить возможность простого и эффективного тестирования правильности укладки полипептидной цепи целевого белка в мембране, например, с помощью тестов, измеряющих его функциональную активность или способность связывать лиганды. Кроме того, применение простых биохимических методов для определения локализации целевых белков в клетке позволит оперативно контролировать встраивание целевого рекомбинантного белка в мембрану. Такой подход повысит эффективность планирования и осуществления экспериментов, позволит ускорить выбор оптимальной стратегии для функциональной экспрессии целевого мембранного белка.

Для разработки способов контролируемой функциональной экспрессии рекомбинантных мембранных белков в клетках *E. coli* нами был выбран гибридный калиевый канал KcsA-Kv1.3, возможность экспрессии которого в клетках бактерий была продемонстрирована ранее [5, 6]. Этот и аналогичные ему гибриды KcsA-Kv1.X были получены путем встраивания функционально-активного сайта связывания с лигандами эукариотических калиевых каналов семейства Kv1 в гомологичный участок бактериального канала KcsA.

Интерес к эукариотическим вольт-зависимым калиевым каналам Kv1 определяется важной ролью этих белков в таких процессах, как проведение нервного импульса, регуляция мускульных сокращений, пролиферация клеток [7]. В настоящее время канал Kv1.3 рассматривается в качестве терапевтической мишени при лечении целого ряда

аутоиммунных заболеваний [8], а тестирование его лиганд-связывающей активности составляет основу поиска новых лекарственных препаратов [9].

Получение гибридных белков KcsA-Kv1.X оказалось возможным вследствие высокой структурной и функциональной гомологии калиевых каналов. По своему строению эти белки являются тетрамерами, каждая субъединица которых содержит шесть (вольт-зависимые эукариотические каналы) или две (бактериальные каналы) трансмембранные спирали. В случае эукариотических каналов концевые спирали S5 и S6, соединенные петлей, образуют пору канала, проводящую ионы калия [10]. Бактериальный калиевый канал KcsA [11], имеющий более простое строение субъединиц, по общему плану строения гомологичен поровым доменам самых различных бактериальных и эукариотических вольт-зависимых каналов. Наибольшая гомология аминокислотной последовательности наблюдается в области поровой петли, соединяющей трансмембранные спирали M1 и M2 этого канала (рис. 1а).

Линкер S5-P эукариотических Kv1 каналов участвует в формировании сайта связывания с пептидными токсинами – природными блокаторами вольт-зависимых каналов [12]. Возможность замены S5-P-линкера KcsA на соответствующий участок Kv1.3 канала привела к созданию гибридного белка KcsA-Kv1.3 (рис. 1б), представляющего собой рецептор с высоким родством к пептидным токсинам [5]. Полученный гибрид сохраняет специфичность связывания с лигандами, присущую эукариотическому каналу Kv1.3, и является, таким образом, подходящей биоинженерной конструкцией для поиска новых модуляторов активности этого канала.

Выбор KcsA-Kv1.3 для настоящего исследования обусловлен, во-первых, достаточно высоким уровнем экспрессии этого белка в *E. coli* (до 2.5 мг/л [5]), что позволяет детектировать этот белок в составе суммарного клеточного лизата с помощью традиционного метода анализа белков – денатурирующего электрофореза в ПААГ. Во-вторых, свойство гибридного белка связывать меченые лиганды может быть использовано для разработки альтернативных методов тестирования локализации мембранных белков в составе клеточной мембраны.

Целью работы является разработка на примере рекомбинантных калиевых каналов технологических подходов для реализации функциональной экспрессии рекомбинантных мембранных белков в составе мембраны клеток *E. coli*, контролируемой на основе методов флуоресцентной микроскопии.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### МАТЕРИАЛЫ

В работе были использованы реактивы фирмы Merck, Германия, и фирмы Sigma, США; детергенты Mega 9 (нонаноил-N-метилглюкамид), N-лаурилсаркозинат натрия (фирмы Amresco, США), Тритон X-100 (фирмы Merck, США); наборы для выделения плазмидной ДНК, очистки ПЦР-фрагментов, экстракции ДНК из агарозного геля (фирмы Qiagen, США); ферменты рестрикции и ДНК-модифицирующие ферменты (фирмы Fermentas, Латвия).

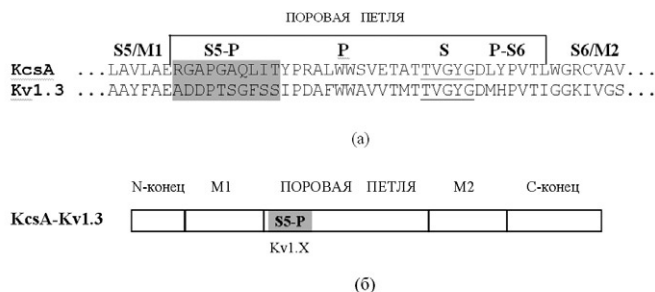


Рис. 1. Гомология аминокислотных последовательностей поровой петли вольт-зависимого канала Kv1.3 и бактериального канала KcsA (а) и схематическое изображение структуры гибрида KcsA-Kv1.3 (б). S5/M1 и S6/M2 – трансмембранные спирали; S5-P и P-S6 – последовательности линкеров; P – поровая спираль; S – последовательность, участвующая в образовании селективного ионного фильтра в составе тетрамера (подчеркнута)

### МЕТОДЫ

В работе использовали общие методы работы с рекомбинантными ДНК [13].

### ЭКСПРЕССИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ГЕНА KcsA-Kv1.3

Ночную культуру клеток *E. coli* BL21(DE3) (фирмы Novagen), трансформированных плазмидой pET28KcsA-Kv1.3, инокулировали в 30.0 мл среды M9, содержащей 40 мкг/мл канамицина, до начальной мутности OD<sub>560</sub> = 0.25 о.е./см. Культуру индуцировали при OD<sub>560</sub> = 1.0 о.е./см добавлением ИПТГ (изопропил-β-D-тиогаляктопиранозид) до конечной концентрации 50 мкМ и продолжали выращивание в течение 18 ч при 37 °С (конечная мутность культуры составляла 2.5-3 о.е./см). Биосинтез белка детектировали путем разделения белков клеточного лизата электрофорезом в денатурирующем 13.5 % полиакриламидном геле (ДСН-ПААГ) по методу Лэммли [14].

### ИММУНОБЛОТТИНГ

Белки из ДСН-ПААГ переносили на нитроцеллюлозный фильтр BA-85 (фирмы Schleisher & Schuell) электрофорезом на приборе Mini-Protean 3 Cell (фирмы Bio-Rad, США) в буфере 25 мМ NaHCO<sub>3</sub>, pH 9.2, 10 % метанол в течение 1.5 ч и токе 0.8 мА/см при 20 °С. Иммунохимическое окрашивание проводили с использованием моноклональных мышиных IgG1 антител (Penta-His, фирмы Qiagen, США) в разведении 1:1000 и конъюгата вторичных антител (анти-IgG1 мыши) с пероксидазой хрена (фирмы Novagen) в разведении 1:3000 в соответствии с методикой производителя. В качестве хромофорного субстрата пероксидазы использовали ТМБ (тетраметилбензидин) в растворе 0.03 % перекиси водорода.

### ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ КЛЕТОК

Пробы для фракционирования готовили осаждением клеток из 30 мл культуры центрифугированием при 4000 г в течение 10 мин при 10 °С. Клетки лизировали в 4 мл буфера А (100мМ NaCl, 5мМ KCl, 50мМ Трис pH 8.0), содержащем 0.5 мг/мл лизоцима, 1 мМ ЭДТА и 1мМ фенилметилсульфофторид, при 4 °С в течение 20 мин, после чего проводили озвучивание в течение 5 мин на приборе Digital Sonifier model 250 (фирмы Branson) импульсами по 10 сек при мощности 200 Вт.

Суспензию центрифугировали 10 мин при 10000 g при 5 °С, осадок отделяли (осадок I), а супернатант центрифугировали 1 ч при 80 000 g при 5 °С на центрифуге TLA 100 (фирмы Beckman) и получали осадок II. Каждый осадок экстрагировали буфером В (0.1 М Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.0, 5mM KCl), содержащим 40 mM Mega 9 (1 % лаурилсаркозин или 1 % Тритон X-100) при качании в течение 3–4 ч, затем проводили повторное центрифугирование и полученные конечные осадки растворяли в буфере для электрофореза в 13.5 % ДСН-ПААГ.

#### ОТМЫВКА МЕМБРАН ЩЕЛОЧНЫМ РАСТВОРОМ КАРБОНАТА НАТРИЯ

Клетки лизировали в буфере С (50mM Tris pH 8, 5mM EDTA), содержащем 1 мг/мл лизоцима. Суспензию подвергали трехкратному замораживанию и размораживанию для вскрытия клеточного, затем проводили озвучивание в течение 1 мин импульсами по 10 сек. К суспензии добавляли равный объем 0.2 М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 12, и инкубировали на ледяной бане в течение 5 мин. Белки, встроенные в мембрану, осаждали центрифугированием в течение 1 ч при 80 000 g и 4 °С. Полученный осадок растворяли для анализа в 13.5 % ДСН-ПААГ.

#### ОЧИСТКА РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА С ПОМОЩЬЮ МЕТАЛЛ-АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Экстракты осадков I или II нанесли на колонку с 1 мл смолы Ni-NTA агарозы (фирмы Qiagen) в буфере В, содержащем 40 mM Mega 9. Смолы промывали раствором 20 mM имидазола, и белок элюировали 0.4 М имидазола в этом же буфере.

#### ПРОЦЕДУРА ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИИ СВЯЗЫВАНИЯ КСА-КV1.3 С ЛИГАНДОМ

Культуру индуцированных клеток BL21(DE3) с белком KcsA-Kv1.3 (1 мл) центрифугировали в течение 10 мин при 5000 xg, осадок суспендировали в буфере А, содержащем 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 М сахарозу, 0.3 mM EDTA и 20 мкг/мл лизоцима, инкубировали в течение 20 мин при 4 °С, затем добавляли MgCl<sub>2</sub> до конечной концентрации 10 mM. Полученную таким образом суспензию сферопластов разбавляли в 100–200 раз буфером А, содержащим 0.25 М сахарозу, и аликвоту (50–70 мкл) вносили в лунку планшета и инкубировали в течение 1.5 ч при 20 °С с флуоресцентно меченным AgTx2 в концентрации 10 нМ. AgTx2, конъюгированный с 5(6)-карбокситетраметилпроламином (Rh-AgTx), был любезно предоставлен Ю. В. Корольковой (ИБХ РАН). Регистрацию образования комплекса мембранного белка KcsA-Kv1.3 с его лигандом Rh-AgTx осуществляли методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии с помощью установки LSM510 META (Zeiss, Германия). Конфокальные флуоресцентные изображения сферопластов, окрашенных Rh-AgTx, измеряли с помощью 63-кратного водоиммерсионного объектива C-Apochromat (числовая апертура 1.2, Zeiss, Германия). Пространственное разрешение составляло около 0.2 мкм в плоскости препарата и 0.5 мкм в направлении оптической оси объектива. Флуоресценцию Rh-AgTx возбуждали He,Ne лазером (543.5 нм, мощность 12 мВт на образце), а испускание флуоресценции регистрировали с помощью длинноволнового барьерного фильтра с границей 585 нм.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРОЦЕДУР ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ И ЭКСТРАКЦИИ ДЕТЕРГЕНТАМИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ КЛЕТОЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ KcsA-Kv1.3

Ген гибридного белка KcsA-Kv1.3 был сконструирован в соответствии с работой [5] и клонирован в плазмиду pET28a (фирмы Novagen). Экспрессию гибридного гена KcsA-Kv1.3 проводили в составе плазмиды pET28KcsA-Kv1.3 в клетках BL21(DE3). Уровень наработки рекомбинантного белка в клетках определяли с помощью анализа суммарного клеточного белка электрофорезом в SDS-ПААГ, а наличие целевого белка в клеточном лизате подтверждали с помощью иммуноблоттинга, используя антитела против участка Hisx6, локализованного на С-конце рекомбинантных белков.

Как известно из литературных источников, рекомбинантный KcsA, а также гибридные белки KcsA-Kv1.3 накапливаются в составе цитоплазматической (внутренней) мембраны *E. coli* [5, 15, 16]. Так, например, выделение гибридных белков [5] проводили из мембранной фракции клеток, полученной путем высокоскоростного центрифугирования клеточного лизата (110 000 g в течение 45 мин). Эту процедуру мы решили использовать для разработки методики фракционирования клеток, направленной на определение клеточной локализации целевых мембранных белков – гибридных калиевых каналов.

Процедура фракционирования клеток, полученных после выращивания индуцированной культуры, основана на разрушении клеток ультразвуком, осаждении фрагментов клеточной стенки и нерастворимых компонентов низкоскоростным центрифугированием при 10 000 g в течение 10 мин (осадок I) и последующем осаждении мембранных везикул высокоскоростным центрифугированием (осадок II). На представленной электрофореграмме (рис. 2а) видно, что гибридный белок KcsA-Kv1.3 содержится в нерастворимой фракции клеток, причем значительное его количество детектируется в осадке II (рис 2а, дорожка 3), что свидетельствует о встраивании рекомбинантного белка в мембрану. Интересным наблюдением является наличие целевого белка в осадке I (рис 2а, дорожка 2). Этот низкоскоростной осадок обычно рассматривается в литературе как фракция, содержащая тела включения – нерастворимые агрегаты целевого белка, образующиеся в результате слипания новосинтезированных рекомбинантных полипептидов в денатурированной форме [17]. В случае экспрессии растворимых белков при выделении рекомбинантных молекул из состава тел включения необходимо проводить процедуру ренатурации белка с целью получения его активной формы. В случае биосинтеза мембранных белков состав низкоскоростного осадка I, а также механизм его образования, по-видимому, могут быть иными. Так, в работе [18] показано, что распределение белков в цитоплазматической мембране клеток *E. coli* неравномерно: с помощью дифференциального центрифугирования были выявлены «легкие» фракции мембран, не содержащие белка, тяжелые фракции, нагруженные белком, а также промежуточные фракции. Учитывая, что в клетках BL21(DE3) происходит суперэкспрессия гибридного белка KcsA-Kv1.3, можно предположить, что осадок I содержит насыщенные белком мембранные везикулы, обладающие большей плотностью, чем мембраны в осадке II. Об этом

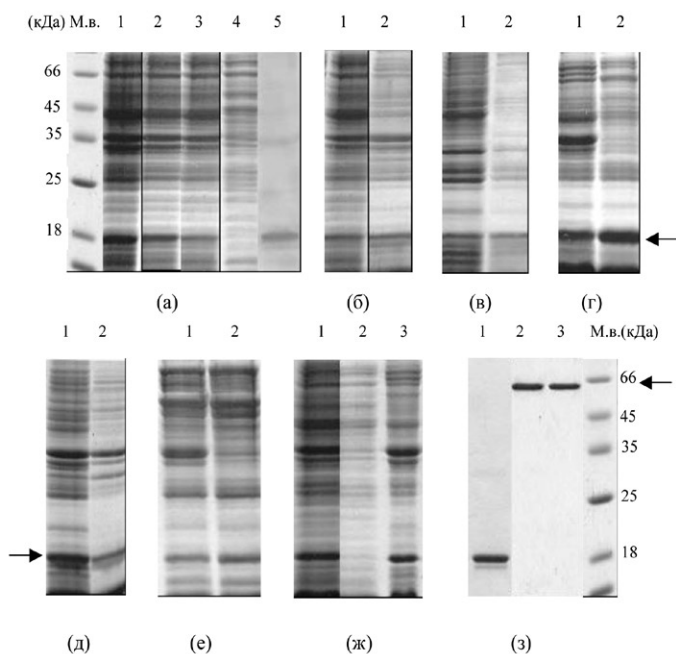


Рис. 2. Фракционирование клеток BL21(DE3), содержащих белок KcsA-Kv1.3 (а). 1 – клеточный лизат; 2 – осадок I; 3 – осадок II; 4 – супернатант после высокоскоростного центрифугирования; 5 – иммуноблот клеточного лизата с анти-Hisx6 антителами. Экстракция осадка I растворами: 40 мМ Мега 9 (б), 1 % лаурилсаркозина (в); 1 % тритона (г). Экстракция осадка II растворами: 40 мМ Мега 9 (д), 1 % тритона (е). 1 – суспензия осадка в детергенте; 2 – экстракт. Фракционирование клеток карбонатным способом (ж). 1 – клеточный лизат; 2 – супернатант после высокоскоростного центрифугирования; 3 – осадок. Анализ образования тетрамерной формы белком KcsA-Kv1.3 (з). 1 – образец KcsA-Kv1.3 с предварительным прогревом в течение 10 мин при 96 °С; 2 – образец KcsA-Kv1.3, выделенный экстракцией 40 мМ Мега 9 из осадка I с предварительным прогревом в течение 10 мин при 37 °С; 3 – образец KcsA-Kv1.3 из осадка II, приготовленный в тех же условиях. М.в. – маркеры молекулярного веса. Стрелкой указано положение целевого белка (мономера или тетрамера)

механизме образования осадка I упоминается в обзоре [2]. Нельзя исключать и того, что осадок I содержит денатурированные молекулы целевого белка.

Исследование осадков I и II проводили с помощью экстракции детергентами. Сначала был использован неионный детергент Мега 9, который обычно применяется для экстракции KcsA и гибридов из мембранной фракции [19]. Как видно на рис. 2б и 2д, обработка обоих осадков этим детергентом привела к растворению целевого белка. Далее осадки экстрагировали мягким ионным детергентом – лауроилсаркозином. Известно, что 1–2 % раствор этого детергента применяется для избирательного растворения цитоплазматической мембраны *E. coli* [20, 21], а в некоторых случаях экспрессии мембранных белков – для растворения низкоскоростного осадка, содержащего целевой белок [22, 23]. Белок KcsA-Kv1.3 полностью экстрагировался из осадков I и II лауроилсаркозином (на рис. 2в представлены результаты по растворимости осадка I). Полная солюбилизация осадков I и II произошла и при их обработке раствором 1 % Тритона X-100 по методу [24] (рис. 2г и 2е). Этот детергент в концентрациях 0.5–1.0 % обычно используется для растворения мембранной фракции клеток, а также для отмывки тел включения от примесных белков [17].

Для подтверждения локализации целевого белка в мембране было проведено определение суммарной фракции

мембранных белков путем отмывки мембран раствором карбоната натрия по методу [25]. Этот метод основан на дифференциальном растворении цитоплазматических агрегированных и мембранно-связанных белков в сильнощелочных условиях (pH = 12) и последующем отделении фракции клеток, содержащей интегральные мембранные белки, центрифугированием. Как видно из рис. 2ж, все количество гибридного белка KcsA-Kv1.3 содержится в осадочной фракции.

На следующем этапе мы провели очистку экстрагированных в Мега 9 белков KcsA-Kv1.3 с помощью металл-аффинной хроматографии на колонке Ni-NTA сепфарозы, а затем анализировали целевой белок электрофорезом в двух режимах – с предварительным прогреванием при 96 °С в течение 10 мин в буфере, содержащем 1 % SDS, и без прогрева. Этот тест, который используется для детекции образования белком KcsA и его мутантными формами нативной четвертичной структуры, основан на исключительной устойчивости тетрамерной формы KcsA в растворах различных детергентов [16]. Так, например, в случае раствора KcsA в 0.1 % SDS температура плавления комплекса составляет 68 °С. Как видно на рис. 2з, гибридный белок KcsA-Kv1.3, выделенный как из осадка I, так и из осадка II, образует тетрамер. Учитывая, что одним из условий образования тетрамерной структуры белком KcsA является наличие липидного окружения [36], а также основываясь на полученных данных о хорошей растворимости гибридного белка из обоих осадков в детергентах – Мега 9, лауроилсаркозине и Тритоне X-100, можно с большой вероятностью предположить, что гибридный белок в осадке I принимает нативную конформацию в составе мембранных везикул. Дополнительным подтверждением наличия мембранных структур в обоих осадках является переход практически всего количества клеточного целевого белка в нерастворимую фракцию при проведении фракционирования карбонатным методом. Полученные результаты позволяют более правильно оценивать данные по фракционированию мембранных белков в *E. coli*, указывая на то, что локализация целевого мембранного белка в «низкоскоростном» осадке I не исключает образования этим белком нативной конформации в мембранном или мембраноподобном окружении.

#### ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕМБРАННОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ KCSA-KV1.3 С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ

Наличие лиганд-связывающего сайта в составе гибридного белка KcsA-Kv1.3 дает возможность детектировать встраивание и фолдинг этого рекомбинантного белка в составе цитоплазматической мембраны *E. coli*. Для этих целей была использована разработанная нами процедура связывания флуоресцентно-меченного пептидного токсина – агитоксина, с белком KcsA-Kv1.3 на поверхности целых клеток *E. coli* [26]. Агитоксин (AgTx2) – это пептид (38 аминокислотных остатков) из яда скорпиона *Leiurus quinquestriatus*, который является эффективным блокатором Kv1.3 канала [27]. Связываясь с внешней стороны поры, токсин препятствует транспорту ионов калия через канал. Агитоксин не проявляет сродства к KcsA, однако взаимодействует с высокой аффинностью с очищенным гибридом KcsA-Kv1.3 ( $IC_{50} = 6.4$  нМ) [5]. Кроме того, AgTx2 чувствителен к структурной целостности KcsA и обычно используется



как инструмент для тестирования образования четвертичной (тетрамерной) структуры канала [28].

Для осуществления флуоресцентной детекции связывания целевого белка с агитоксином клетки BL21(DE3), продуцирующие целевой белок KcsA-Kv1.3, предварительно обрабатывали лизоцимом для получения сферопластов с целью удаления клеточной стенки бактерий и обеспечения тем самым доступа меченого лиганда к цитоплазматической мембране. После инкубации сферопластов с Rh-AgTx2 проводили детекцию связывания с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа. На представленной микрофотографии (рис. 3) видно, что флуоресцентный сигнал детектируется на поверхности клеточной мембраны бактерий. В контрольных клетках BL21(DE3), не содержащих плазмиды, а также в клетках, продуцирующих канал KcsA, связывание отсутствовало. Результаты тестирования указывают, что гибридный белок KcsA-Kv1.3 локализован в бактериальной мембране в функционально-активной форме, способной специфически связывать лиганд, пептидный токсин.

В результате проведенных экспериментов показано, что совокупность используемых методов (биохимических и флуоресцентных методов анализа) позволяет адекватно оценивать локализацию рекомбинантных белков – гибридных калиевых каналов в цитоплазматической мембране *E. coli* и контролировать правильность укладки полипептидной цепи по способности белка связывать специфический лиганд.

## ВЫВОДЫ

1. На модельной системе мембранного белка KcsA-Kv1.3 разработан подход к изучению мембранной локализации в клетках *E. coli* рекомбинантных каналов, содержащих функционально-активные участки вольт-зависимых эукариотических калиевых каналов. Технологическая схема, основанная на использовании традиционных биохимиче-

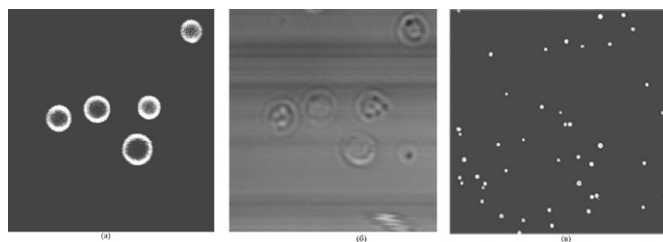


Рис. 3. Связывание гибридного белка KcsA-Kv1.3 с флуоресцентно-меченым лигандом на поверхности бактерий. Цифровые микрофотографии клеток BL21(DE3), продуцирующих KcsA-Kv1.3. (а, в) – флуоресцентные изображения в диапазоне  $\lambda > 585$  нм; (б) – клетки в проходящем свете

ских методов анализа, а также на разработанном нами методе флуоресцентной детекции, включает:

- фракционирование клеток, продуцирующих рекомбинантные мембранные белки, с помощью дифференциального центрифугирования клеточного лизата;
- исследование осадочных фракций путем экстракции различными детергентами;
- обнаружение мембранных белков в клеточном лизате «карбонатным» методом;
- определение тетрамерной структуры канала с помощью ДСН-ПААГ;
- детекцию в составе целых клеток *E. coli*, продуцирующей целевой белок, встраивания целевого белка в цитоплазматическую мембрану и образования им правильной тетрамерной структуры канала с помощью флуоресцентных методов.

2. Показано, что осадок, полученный низкоскоростным центрифугированием при фракционировании клеточного лизата, содержит целевой белок, образующий правильную тетрамерную конформацию в мембранном окружении. ●

Данная работа была выполнена при финансовой поддержке программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология»

## Список литературы

1. Byrne V., Iwata S. Membrane protein complexes. *Curr Opin in Struct Biol* 2002. 12. P. 239-243.
2. Grishhammer R., Tate C.G. Overexpression of integral membrane proteins for structural studies. *Q Rev. Biophys* 1995. 28. P. 314-422.
3. Jana S., Deb J.K. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005. 67. P. 289-298.
4. Drew D., Fröderberg L., Baars L., de Gier J.W. Assembly and overexpression of membrane proteins in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 2003. 1610. P. 3-10.
5. Legros C., Pollmann V., Knaus H.-G., Farrell A.M., Darbon H., Bougis P.E., Martin-Eauclaire M.F., Pongs O. Generating a high-affinity scorpion toxin receptor in KcsA-Kv1.3 chimeric potassium channels. *J Biol Chem* 2000. 275. P. 16918-16924.
6. Legros C., Schulze C., Garcia M.L., Bougis P.E., Martin-Eauclaire M.F., Pongs O. Engineering-specific pharmacological binding sites for peptidyl inhibitors of potassium channels into KcsA. *Biochemistry* 2002. 41. P. 15369-15375.
7. Shieh C.C., Coghlan M., Sullivan J.P., Gopalakrishnan M. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol Rev* 2000. 52. P. 557-594.
8. Beeton C., Wulff H., Barbara J., Clot-Faybesse O., Pennington M., Bernard D., Cahalan M.D., Chandy K.G., Béraud E. Selective blockade of T lymphocyte K(+) channels ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis, a model for multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001. 98. P. 13942-13947.
9. Kaczorowski G.J., Garcia M.L. Pharmacology of voltage-gated and calcium-activated potassium channels. *Curr Opin Chem Biol* 1999. 3. P. 448-458.
10. MacKinnon R. Potassium channels. *FEBS Lett* 2003. 555. P. 62-65.
11. Doyle D.A., Morais Cabral J., Pfuetzner R.A., Kuo A., Gulbis J.M., Cohen S.L., Chait B.T., MacKinnon R. The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science* 1998. 280. P. 69-77.
12. MacKinnon R., Cohen S.L., Kuo A., Lee A., Chait B.T. Structural conservation in prokaryotic and eukaryotic potassium channels. *Science* 1998. 280. P. 106-109.
13. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
14. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970. 227. P. 680-685.
15. Irizarry S.N., Kutluay E., Drews G., Hart S.J., Heginbotham L. Opening the KcsA K<sup>+</sup> channel: tryptophan scanning and complementation analysis lead to mutants with altered gating. *Biochemistry* 2002. 41. P. 13653-13662.
16. Cortes D.M., Perozo E. Structural dynamics of the Streptomyces lividans K<sup>+</sup> channel (SKC1): oligomeric stoichiometry and stability. *Biochemistry* 1997. 36. P. 10343-10352.
17. Singh S.M., Panda A.K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J Biosci Bioeng* 2005. 99. P. 303-310.
18. van Heerikhuizen H., Kwak E., van Bruggen E.F., Witholt B. Characterization of a low density cytoplasmic membrane subfraction isolated from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 1975. 413. P. 177-191.
19. Schrepff H., Schmidt O., Kümmerlen R., Hinnah S., Müller D., Betzler M., Steinkamp T., Wagner R. A prokaryotic potassium ion channel with two predicted transmembrane segments from *Streptomyces lividans*. *EMBO J* 1995. 14. P. 5170-5178.
20. Carlone G.M., Thomas M.L., Rumschlag H.S., Sottnek F.O. Rapid microprocedure for isolating detergent-insoluble outer membrane proteins from Haemophilus species. *J Clin Microbiol* 1986. 24. P. 330-332.
21. Gauthier A., Puente J.L., Finlay B.B. Secretin of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system requires components of the type III apparatus for assembly and localization. *Infect Immun* 2003. 71. P. 3310-3319.
22. Fiermonte G., Walker J.E., Palmieri F. Abundant bacterial expression and reconstitution of an intrinsic membrane-transport protein from bovine mitochondria. *Biochem J* 1993. 294. P. 293-299.
23. Kerman A., Ananthanarayanan V.S. Expression and spectroscopic characterization of a large fragment of the mu-opioid receptor. *Biochim Biophys Acta* 2005. 1747. P. 133-40.
24. Shimada Y., Wang Z.Y., Mochizuki Y., Kobayashi M., Nozawa T. Functional expression and characterization of a bacterial light-harvesting membrane protein in *Escherichia coli* and cell-free synthesis systems. *Biosci Biotechnol Biochem* 2004. 68. P. 1942-1948.
25. van Dalen A., Schrepff H., Killian J.A., de Kruijff B. Efficient membrane assembly of the KcsA potassium channel in *Escherichia coli* requires the protonmotive force. *EMBO Rep* 2000. 1. P. 340-346.
26. Nekrasova O.V., Ignatova A.A., Nazarova A.I., Feofanov A.V., Korolkova Y.V., Boldyreva E.F., Tagvev A.I., Grishin E.V., Arseniev A.S., Kirpichnikov M.P. Recombinant Kv channels at the Membrane of *Escherichia coli* Bind Specifically Agitoxin2. *J Neuroimmune Pharmacol* 2009. 4. P. 83-91.
27. Garcia M.L., Garcia-Calvo M., Hidalgo P., Lee A., MacKinnon R. Purification and characterization of three inhibitors of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels from *Leiurus quinquestriatus* var. *hebraeus* venom. *Biochemistry* 1994. 33. P. 6834-6839.
28. Valiyaveetil F.I., MacKinnon R., Muir T.W. Semisynthesis and folding of the potassium channel KcsA. *J Am Chem Soc* 2002. 124. P. 9113-9120.

УДК 577.2

# Бесклеточная продукция внеклеточного домена никотинового ацетилхолинового рецептора

Е. Н. Люкманова<sup>1#</sup>, Г. С. Копейна<sup>2</sup>, М. А. Шулепко<sup>2</sup>, З. О. Шенкарев<sup>1</sup>,  
А. С. Арсеньев<sup>1</sup>, Д. А. Долгих<sup>1,2</sup>, М. П. Кирпичников<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова,  
РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

<sup>2</sup>Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова  
# e-mail: genchem@ibch.ru

**Н**икотиновые ацетилхолиновые рецепторы (нАХР) являются лиганд-зависимыми ионными каналами, встроенными в постсинаптические мембраны нейронов [1]. нАХР состоят из пяти гомологичных субъединиц, трансмембранные части которых образуют ионопроводящую пору, а внеклеточные N-концевые домены содержат сайты связывания лигандов (рис. 1). В нервной системе млекопитающих существует гомопентамер нАХР  $\alpha 7$  типа ( $\alpha 7$ нАХР), с дисфункциями которого связано развитие ряда тяжелых заболеваний нервной и эндокринной систем [2]. Исследования нАХР и разработка препаратов для лечения подобных заболеваний требует высокоэффективных систем продукции отдельных субъединиц и доменов рецептора, создание которых затруднено из-за склонности этих белков к агрегации [3].

Несколько лет назад группой американских ученых была определена пространственная структура ацетилхолинсвязывающего белка из моллюска *Lymnaea stagnalis* (АХСБ) [4]. АХСБ – водорастворимый белок, состоящий из пяти

одинаковых субъединиц, он имеет 25 % гомологию с внеклеточным доменом  $\alpha 7$ нАХР ( $\alpha 7$ ВД) и взаимодействует с такими лигандами нАХР, как ацетилхолин,  $\alpha$ -конотоксины и  $\alpha$ -нейротоксины [4]. Было показано, что замена фрагмента внеклеточного домена, заключенного между двумя цистеиновыми остатками 128 и 142 (г. н. Cys-loop фрагмента) на гомологичный участок из АХСБ приводит к значительному повышению растворимости  $\alpha 7$ ВД [5].

В течение последних 10 лет бесклеточные системы, в особенности диализного типа (SECF-continuous exchange cell free), успешно используются для получения рекомбинантных белков [7, 8]. У этих систем есть несколько преимуществ перед системами, основанными на клеточной продукции: во-первых, можно решить проблему агрегации путем ввода в реакционную смесь агентов, позволяющих удерживать синтезирующийся полипептид в растворе; во-вторых, можно проводить синтез изотопно-меченных по определенным аминокислотным остаткам белков для структурных исследований.

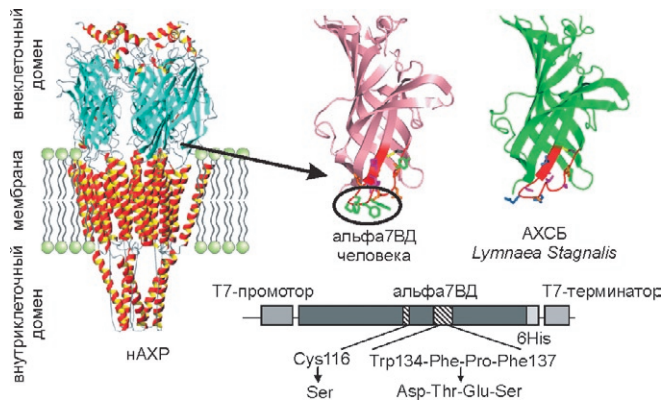


Рис. 1. Модель пространственной структуры hAHP [1]. Сравнение модели субъединицы  $\alpha 7$ ВД [6] с пространственной структурой субъединицы АХСБ [4]. Схема введения мутаций в ген  $\alpha 7$ ВД

Целью данной работы было создание эффективной системы бесклеточной продукции  $\alpha 7$ ВД человека. Для этого на основе полноразмерного гена  $\alpha 7$ hAHP (любезно предоставлен проф. Й. Линдстрёмом) были получены два мутантных гена  $\alpha 7$ ВД, содержащие замены, возможно, приводящие к повышению растворимости домена. Один ген ( $\alpha 7$ ВД/C116S/Cys-loop) кодировал последовательность  $\alpha 7$ ВД с заменой неспаренного остатка Cys116 на остаток Ser [3] и заменой фрагмента Cys-loop/ $\alpha 7$ ВД (Cys128–Cys142) на фрагмент Cys-loop/АХСБ [5]. При анализе модели  $\alpha 7$ ВД, предложенной в [6] (рис. 1), было замечено, что фрагмент 134–137  $\alpha 7$ ВД имеет гидрофобную природу и, возможно, контактирует с мембранным окружением целого рецептора. В то же время аналогичный участок молекулы АХСБ содержит только гидрофильные остатки (рис. 1). Мы предположили, что для улучшения растворимых свойств  $\alpha 7$ ВД будет достаточным произвести замену только четырех аминокислотных остатков Trp134-Phe-Pro-Phe137, принадлежащих Cys-loop, на остатки Asp-Thr-Glu-Ser гомологичного участка АХСБ. Вторым ген ( $\alpha 7$ ВД/C116S/DTES) кодировал последовательность  $\alpha 7$ ВД с этой заменой и заменой Cys116Ser (рис. 1).

Мутантные гены с дополнительной последовательностью, кодирующей 6His на С-конце молекулы, были клонированы в коммерческий вектор pET22b(+). При синтезе обоих вариантов в бесклеточной системе большая часть белкового препарата накапливалась в виде нерастворимых агрегатов, и лишь небольшая часть целевого белка оставалась в растворе (рис. 2, дорожки 2-4). Причиной агрегации, возможно, служили неправильное формирование дисульфидных связей и стремление фрагмента рецептора к самопроизвольной пентамеризации, присущей  $\alpha 7$ ВД [9]. Эксперименты показали, что добавление в трансляционную смесь (ТС) смесей восстановленного (GSH) и окисленного (GSSG) глутатионов в концентрации 0.1 mM и 0.5 mM соответственно повышало растворимую долю целевого белка до 30% (рис. 2, дорожки 5-7). Присутствие в ТС низкомолекулярного агониста hAHP, 20 mM карбамоилхолина (КБМХ), также приводило к увеличению выхода растворимой фракции до 30% (рис. 2, дорожки 8-10). Добавление в ТС мягкого неионного детергента Brij-35 в концентрации

0.5% как агента, препятствующего самопроизвольной пентамеризации, наряду с добавлением глутатионов привело к синтезу практически полностью растворимого белка (рис. 2, дорожки 11-13). Следует отметить, что оба химерных варианта  $\alpha 7$ ВД демонстрировали одинаковое поведение как при синтезе белка, так и при последующих манипуляциях. Поэтому дальнейшая работа была продолжена только с вариантом  $\alpha 7$ ВД/C116S/DTES.

При дальнейшей очистке химерных белков из ТС с помощью металл-афинной хроматографии происходила практически полная преципитация белковых препаратов. Поэтому были подобраны условия ренатурации  $\alpha 7$ ВД/C116S/DTES из осадка ТС. Были реализованы различные подходы для растворения осадка, включающие использование как 8 M мочевины, 6 M гуанидинхлорида, так и 1% раствора детергента лаурилсаркозина натрия (LS). Наибольшая эффективность растворения  $\alpha 7$ ВД/C116S/DTES из осадка была достигнута при использовании смеси 3 M мочевины и 1% LS в присутствии ДТТ. Дальнейшая ренатурация  $\alpha 7$ ВД/C116S/DTES происходила на металл-афинной смоле в результате промывки смесью GSSG/GSH и в градиенте понижения концентрации мочевины и LS. Однако полученный белковый препарат обладал низкой стабильностью в растворе. Тогда был использован вариант ренатурации, в котором 1% LS постепенно заменяли на 0.1%  $\beta$ -додецилмальтозид (DDM) или 0.1% додецилфосфолин (DPC). В результате были получены стабильные (более 1 месяца при +4 °C) белковые препараты с конечным выходом 1 мг белка с 1 мл трансляционной смеси. Препараты  $\alpha 7$ ВД в DDM и DPC были проанализированы с помощью гель-фильтрации (рис. 3). В случае использования DDM белок находился преимущественно в виде растворимых высокомолекулярных агрегатов (рис. 3), а использование DPC позволило получить гомогенный (>90%) препарат  $\alpha 7$ ВД с диаметром частиц около 7 нм, что соответствует размеру мономера  $\alpha 7$ ВД (5 нм) в комплексе с мицеллой DPC (4 нм).

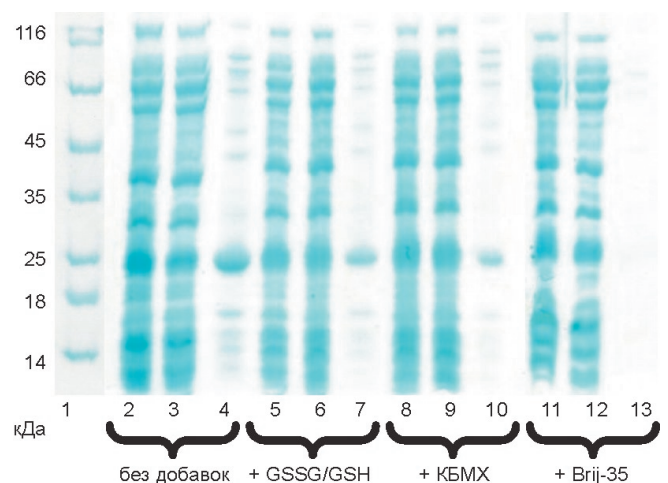


Рис. 2. Электрофоретический анализ синтеза  $\alpha 7$ ВД/C116S/DTES в бесклеточной системе. 1 – маркеры молекулярных весов; 2, 5, 8, 11 – общий белок ТС; 3, 6, 9, 12 – растворимая фракция ТС; 4, 7, 10, 13 – нерастворимая фракция ТС

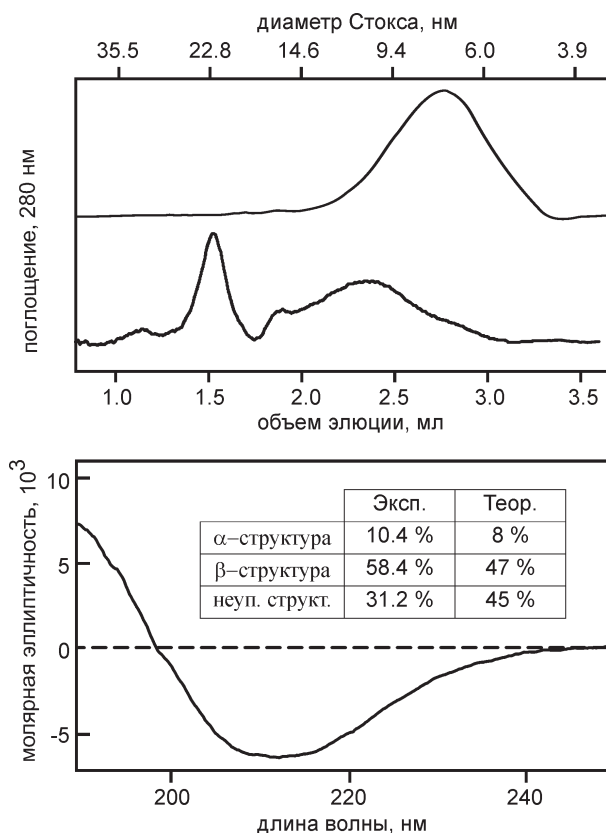


Рис. 3. Анализ с помощью гель-фильтрации на смоле Superdex-200 (GE Healthcare)  $\alpha$ 7ВД/С116S/DTES в растворе DDM и DPC. КД-спектр  $\alpha$ 7ВД/С116S/DTES в растворе DPC

Анализ вторичной структуры  $\alpha$ 7ВД/С116S/DTES в растворе DPC методом КД спектроскопии выявил преобладание  $\beta$ -структуры, что соответствует теоретически рассчитанным значениям (рис. 3). Способность  $\alpha$ 7ВД/С116S/DTES в растворе DPC взаимодействовать с антагонистами НАХР была исследована методом ЯМР-спектроскопии с использованием  $^{15}\text{N}$ -меченого аналога длинного нейротоксина НТII/NTI, полученного, как описано в [10]. Раствор токсина в DPC титровали раствором домена рецептора, и по ослаблению сигналов токсина в 1D  $^{15}\text{N}$ -HSQC спектре судили о взаимодействии токсина с  $\alpha$ 7ВД (рис. 4). Было показано, что каждая молекула  $\alpha$ 7ВД специфически связывает две молекулы токсина с эффективной константой около 2 мкМ и сравнительно большой кооперативностью (коэффициент Хилла 1.8).

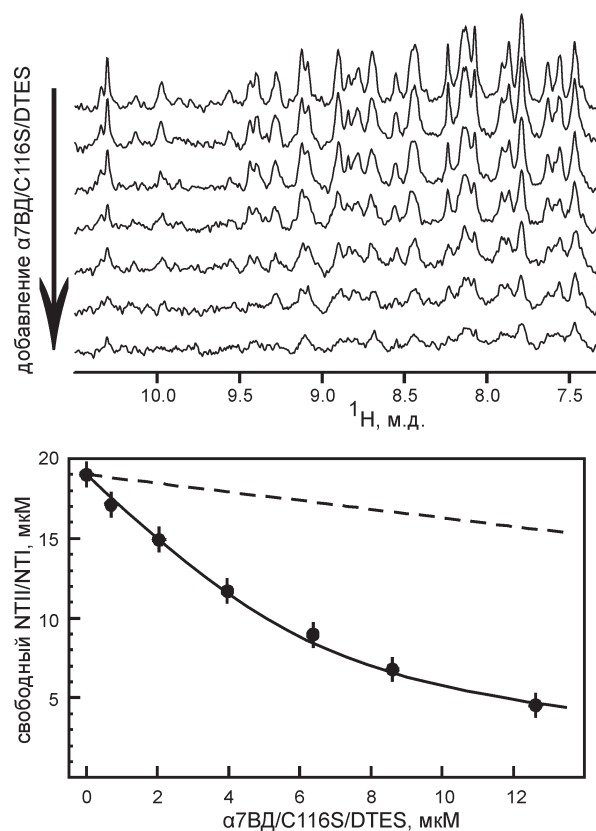


Рис. 4. 1D  $^{15}\text{N}$ -HSQC спектры ЯМР токсина НТII/I в присутствии мицелл DPC и возрастающих концентраций  $\alpha$ 7ВД/С116S/DTES, а также полученная на их основе изотерма связывания. Кривая разведения показана пунктирной линией

Таким образом, нами разработана новая система бактериальной бесклеточной продукции активного внеклеточного домена  $\alpha$ 7НАХР. Добавление DPC способствует стабилизации домена в растворе, сохраняя вторичную структуру и не препятствуя взаимодействию с антагонистами. Разработка данной системы открывает новые перспективы для структурно-функциональных исследований взаимодействия НАХР с его лигандами. ●

*Данная работа была выполнена при финансовой поддержке Российской академии наук (программа «Молекулярная и клеточная биология»), Российского фонда фундаментальных исследований и при поддержке гранта Президента РФ «молодой кандидат» МК-6386.2008.4.*

Список литературы:

- Unwin N. J. Mol. Biol. 2005. 346. 967
- Sharma G., Vijayaraghavan S. Curr Med Chem. 2008. 5(28). 2921-32.
- Tsetlin V.I., Dergousova N.I., Azeeva E.A., Kryukova E.V., Kudelina I.A., Shibanova E.D., Kasheverov I.E., Methfessel C. Eur. J. Biochem. 2002. 269. 2801-2809
- Brejč K., Jvan Dijk W., Klaassen R.V., Schuurmans M., van der Oost J., Smit A.B., Sixma T.K. Nature 2001. 411. 269-276
- Avramopoulou V., Mamalaki A., Tzartos S.J. J. Biol. Chem., 2004. 279(37). 38287-93.
- Fruchart-Gaillard C., Gilquin B., Antil-Delbeke S., Le Novère N., Tamiya T., Corringer

- P.J., Changeux J.P., Ménez A., Servent D. Proc. Natl. Acad. Sci., 2002. 99(5). 3216-21.
- Klammt C., Schwarz D., Eifler N., Engel A., Piehler J., Haase W., Hahn S., Dötsch V., Bernhard F. J. Struct. Biol., 2007. 158(3). 482-93.
- Klammt C., Lohr F., Schafer B., Haase W., Dötsch V., Ruterjans H., Glaubitz C., Bernhard F. FEBS Lett., 2004. 271. 568-580.
- Wells G.B., Anand R., Wang F., Lindstrom J. J. Biol. Chem., 1998. 273(2). 964-73.
- Lyukmanova E.N., Shenkarev Z.O., Schulga A.A., Ermolyuk Y.S., Mordvintsev D., Utkin Y.N., Shoulepkov M.A., Hogg R., Bertrand D., Dolgikh D.A., Tsetlin V.I., Kirpichnikov M.P. J. Biol. Chem., 2007. 282(34). 24784-91.

УДК 577.21

# Определение полной нуклеотидной последовательности митохондриального генома возбудителя описторхоза, *Opisthorchis felineus*

В. А. Мордвинов<sup>1</sup>, А. В. Марданов<sup>2</sup>, Н. В. Равин<sup>2</sup>, С. В. Шеховцов<sup>1</sup>,  
С. А. Демаков<sup>1</sup>, А. В. Катохин<sup>1</sup>, Н. А. Колчанов<sup>1</sup>, К. Г. Скрябин<sup>2#</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, д. 10.

<sup>2</sup> Центр «Биоинженерия» РАН, 117312, Москва, просп. 60-летия Октября, д. 7, корп. 1.

# e-mail: office@biengi.ac.ru

**РЕФЕРАТ** Печеночная трематода *Opisthorchis felineus* является возбудителем описторхоза – опасного заболевания человека и животных, широко распространенного в России, в основном на территории Западной Сибири. В настоящей работе мы определили полную нуклеотидную последовательность митохондриальной ДНК этого плоского червя. Были использованы два метода: секвенирование методом капиллярного электрофореза фрагментов митохондриального генома, полученных специфической ПЦР-амплификацией, и параллельное пиросеквенирование препарата геномной ДНК. Обе методики позволили определить полную нуклеотидную последовательность митохондриального генома *O. felineus*. Он представляет собой кольцевую молекулу длиной 14277 нт с 35 генами, кодирующими 2 рРНК, 22 тРНК и 12 белков, включая 3 субъединицы цитохром С оксидазы, семь субъединиц NADH-дегидрогеназы, апоцитохром Б и субъединицу 6 АТФ синтетазы. Как и у других плоских червей, ген субъединицы 8 АТФ-синтетазы отсутствует. Из 22 тРНК 19 имеют типичную структуру «листа клевера». У тРНК-Ser(AGC) и тРНК-Cys отсутствуют DHU-петли, а для гена тРНК-Ser(UCA) возможны две альтернативные структуры, с DHU-петлей и без нее. Анализ результатов пиросеквенирования позволил идентифицировать 45 однонуклеотидных полиморфизмов в митохондриальном геноме. Данные о нуклеотидной последовательности митохондриального генома *O. felineus* могут быть использованы для разработки методов молекулярной диагностики описторхоза. Полученные результаты показывают, что метод пиросеквенирования может быть использован для быстрой расшифровки митохондриальных геномов животных.

## ВВЕДЕНИЕ

Плоский червь *Opisthorchis felineus* (класс *Trematoda*, сем. *Opisthorchiidae*) – печеночная двуустка, является паразитом рыбоядных животных, а также человека. Описторхозом заражено около 2 млн людей, главным образом живущих на территории России и республик бывшего СССР – Украины, Белоруссии и Казахстана [1, 2]. В некоторых северных населенных пунктах описторхозом заражено до 90 % населения [1].

Несмотря на столетнюю историю изучения *O. felineus* и его огромную практическую важность, многие вопросы его популяционной и эволюционной биологии остаются неизученными, что объясняется главным образом малым количеством пригодных для исследований признаков. С развитием молекулярно-генетических методов на чаше широко применяются молекулярные маркеры. Исследования, проведенные на описторхидах молекулярными методами [3, 4, 5], показали недостаточное разнообразие

используемых на сегодняшний момент молекулярных маркеров. Для получения пригодных для широкого круга исследований молекулярных маркеров наиболее перспективным является исследование структуры полного митохондриального генома *O. felineus*.

У большинства видов животных митохондриальные геномы (мтДНК) отличаются рядом особенностей, которые делают их незаменимыми инструментами для филогенетических и филогеографических исследований: наследование по материнской линии, отсутствие рекомбинации и высокая по сравнению с ядерным геномом скорость эволюции [6]. С увеличением числа просеквенированных митохондриальных геномов они стали широко применяться для подбора генетических маркеров с высокой скоростью эволюции и для построения высокоразрешающих филогенетических деревьев, в которых в качестве признаков используются как сами последовательности, так и порядок расположения генов.

В данной работе мы представляем две методологии определения полной нуклеотидной последовательности митохондриального генома *O. felineus* и анализ его структуры.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### ИСТОЧНИК БИОМАТЕРИАЛА И ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК

Мариты *O. felineus* были выделены из зараженной кошки из д. Усть-Тула (Новосибирская область, Российская Федерация). Видовая принадлежность была определена по морфологическим признакам специалистами лаборатории паразитоценологии и ихтиологии Института систематики и экологии животных СО РАН. ДНК для обоих методов секвенирования была выделена из пулированных образцов фенол-хлороформным методом [7].

Табл. 1. Набор генов митохондриального генома *O. felineus*

ген	длина, п.н.	старт-кодон	стоп-кодон	ген	длина, п.н.	старт-кодон	стоп-кодон
cox3	642	ATG	TAG	nd3	354	GTG	TAG
tRNA-His	67			tRNA-Ser(AGN)	61		
cob	1110	ATG	TAG	tRNA-Trp	68		
nd4L	261	ATG	TAG	cox1	1560	GTG	TAG
nd4	1275	ATG	TAG	tRNA-Thr	63		
tRNA-Gln	63			16S rRNA	994		
tRNA-Phe	66			tRNA-Cys	60		
tRNA-Met	68			12S rRNA	780		
atp6	513	ATG	TAG	cox2	639	ATG	TAG
nd2	867	ATG	TAG	nd6	459	ATG	TAG
tRNA-Val	65			tRNA-Tyr	62		
tRNA-Ala	62			tRNA-Leu(CUN)	64		
tRNA-Asp	67			tRNA-Ser(UCN)	72		
nd1	900	GTG	TAG	tRNA-Leu(UUR)	65		
tRNA-Asn	71			tRNA-Arg	68		
tRNA-Pro	64			nd5	1602	ATG	TAG
tRNA-Ile	62			tRNA-Glu	72		
tRNA-Lys	65			tRNA-Gly	67		

### РАСШИФРОВКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ мтДНК *O. FELINEUS* МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА ПО СЭНДЖЕРУ

Путем сравнения митохондриальных геномов трематод *Fasciola hepatica* (AF216697), *Paragonimus westermani* (AF216698) и *Schistosoma mansoni* (AF216698) при помощи программ MEME/MAST (<http://meme.sdsc.edu/>) были обнаружены консервативные последовательности, характерные для геномов трематод. Используя эти последовательности, а также опубликованные последовательности *Clonorchis sinensis* (DQ116944, AY264851) и *O. viverrini* (DQ882172, DQ119551), подобрали универсальные праймеры. При помощи этих праймеров был получен набор ампликонов длиной около 1000 п.н., на основании последовательности которых были синтезированы новые праймеры. Таким образом, была амплифицирована оставшая часть митогенома в виде перекрывающихся фрагментов. Секвенирование большинства ампликонов проводилось напрямую; часть ампликонов были клонированы, после чего проводилось секвенирование минимум трех клонов. Секвенирование мтДНК проводилось на автоматическом секвенаторе фирмы Applied Biosystems ABI PRISM 3100 – Avant Genetic Analyzer в межинститутском центре секвенирования ДНК СО РАН. Полная последовательность мтДНК *O. felineus* представлена в GenBank (NC\_011127).

### РАСШИФРОВКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ мтДНК *O. FELINEUS* МЕТОДОМ ПИРОСЕКВЕНИРОВАНИЯ

Для определения нуклеотидной последовательности генома *O. felineus* методом пиросеквенирования нами была использована методология, реализованная компанией 454 Life Science на геномном анализаторе GS FLX. Получение библиотеки случайных фрагментов ДНК, клональную амплификацию связанных с микрочастицами молекул ДНК в водно-масляных эмульсиях и секвенирование на GS FLX проводили с использованием наборов реактивов и по протоколам фирмы-производителя (Roche). За один запуск прибора (12 ч) было определено около 100 млн нт, причем средняя длина «чтения» составляла около 220 нт.

Сборку полученного на GS FLX набора перекрывающихся последовательностей в объединяющие их «континги» осуществляли с помощью пакета программ GS *de novo* Assembler (Roche Diagnostics, Roche Applied Science). В результате была определена полная нуклеотидная последовательность контига длиной 14277 нт, представляющего собой митохондриальный геном. Средняя кратность чтения мтДНК составляла около 30 раз.

### БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ

Анализ последовательностей и сборка генома проводились при помощи программы Vector NTI 7 (Informax Inc.). Поиск сходных последовательностей был проведен в базах данных биологических последовательностей GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Для трансляции белок-кодирующих последовательностей был использован митохондриальный генетический код плоских червей [8]. Большинство тРНК были найдены программой tRNAscan-SE [9]; вторичные структуры остальных были найдены вручную.

Для идентификации потенциальных однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) отдельные последовательности,

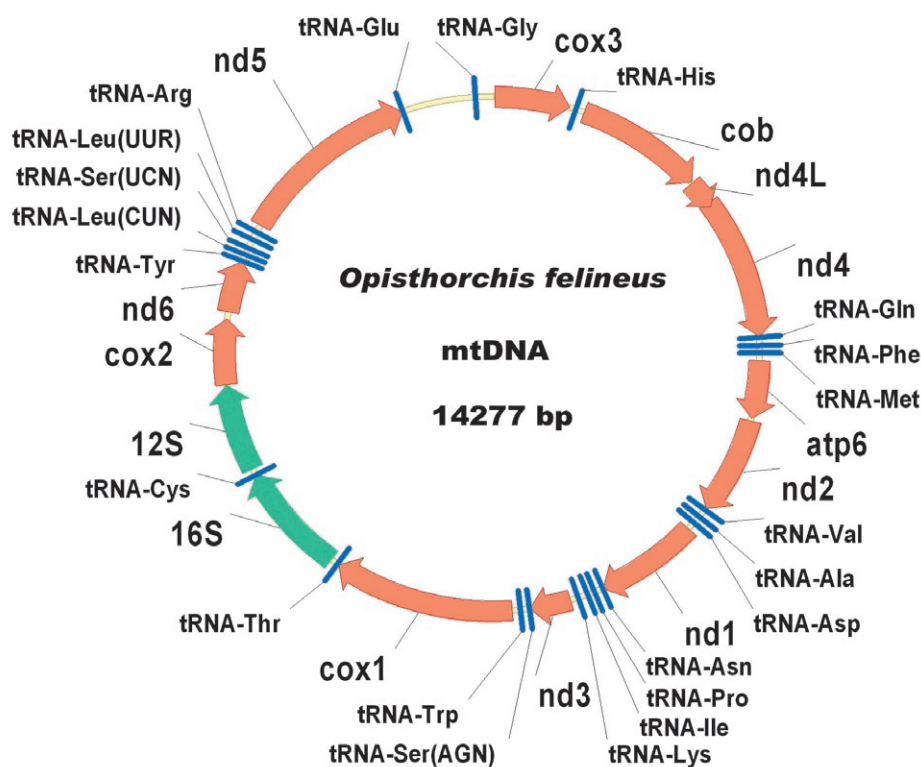


Рис. 1. Генетическая карта митохондриального генома *O. felineus*

определенные при проведении пиросеквенирования, выравнивали относительно «консенсусной» последовательности мтДНК *O. felineus* с помощью программы GS reference mapper (Roche). SNP определяли по наличию не менее чем трех индивидуальных чтений, последовательность которых отличается от «консенсусной» в данной точке. Также к SNP относили все точки несовпадения между полными последовательностями мтДНК, определенными с помощью капиллярного электрофореза и методом пиросеквенирования.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### МЕТОДОЛОГИЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛНОЙ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ мтДНК

Благодаря своей относительно небольшой длине митохондриальные геномы животных стали одними из первых объектов геномных исследований [10], а к настоящему времени известны полные последовательности сотен мтДНК.

Стандартный метод расшифровки митохондриального генома предполагает выделение митохондрий из клеток и получение препарата митохондриальной ДНК, максимально очищенного от геномной ДНК. Последующее «сэнжеровское» секвенирование предполагает разбиение генома на ряд случайно выбранных фрагментов, их клонирование в плазмидном векторе («библиотека случайных фрагментов») и секвенирование полученных клонов с помощью капиллярного электрофореза. Поскольку фрагменты являются перекрывающимися, полученные последовательности могут быть объединены в полную последовательность мтДНК. В данной работе для специфического выделения митохондриальных последовательностей мы использовали информацию о структуре мтДНК близ-

кородственных гельминтов, позволившую идентифицировать консервативные участки генома и амплифицировать с помощью ПЦП расположенные между ними фрагменты мтДНК *O. felineus*. Последовательности полученных фрагментов были определены с помощью капиллярного электрофореза и объединены в полную последовательность мтДНК длиной 14277 нт.

Новым методом, позволяющим определять de novo геномные последовательности, является метод пиросеквенирования [11], реализованный компанией 454 Life Science на геномном анализаторе GS FLX. Этот метод предполагает фрагментацию ДНК до 300–800 нт, амплификацию связанных с микрочастицами индивидуальных фрагментов ДНК в микрокаплях, образуемых в водно-масляных эмульсиях, нанесение наночастиц с иммобилизованными амплифицированными фрагментами в микроячейки на стеклянной пластине, параллельное проведение реакций «пиросеквенирования» и регистрацию результатов в каждой из нескольких сотен тысяч находящихся на пластине ячеек. Средняя длина чтения каждой реакции составляет около 200 нт, что позволяет за один запуск прибора определять последовательность до 100 млн нт. Большой объем последовательностей, определяемый с помощью этого метода, позволил нам отказаться от специфического выделения фрагментов митохондриального генома и использовать для секвенирования препарат «суммарной» геномной ДНК *O. felineus*. Несмотря на то, что доля последовательностей мтДНК в общем объеме секвенирования составила менее 1 %, этого оказалось достаточно для прочтения мтДНК с 30-кратным перекрытием, что обеспечило полную «сборку» последовательности митохондриального генома после одного запуска GS FLX.

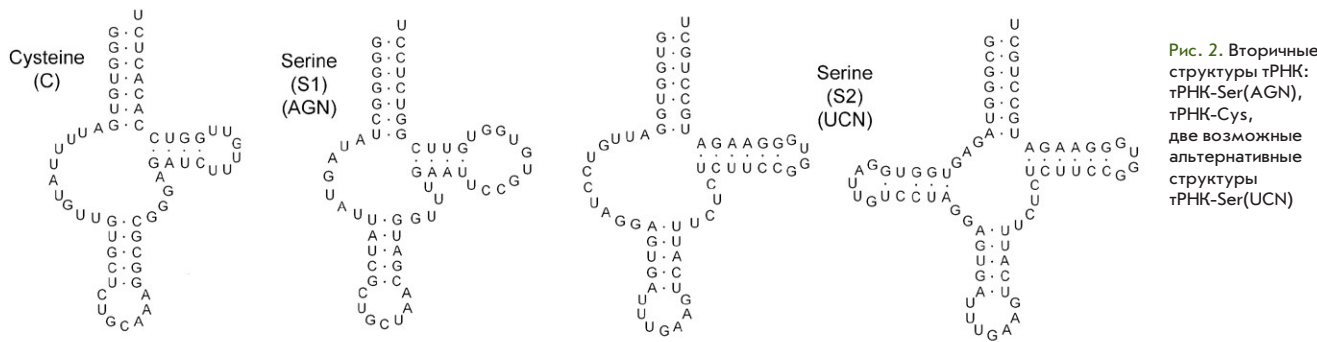


Рис. 2. Вторичные структуры тРНК: тРНК-Ser(AGN), тРНК-Cys, две возможные альтернативные структуры тРНК-Ser(UCN)

Табл. 2. Использование кодонов в митохондриальном геноме *O. felineus*

UUU	Phe	334	9.9 %	UCU	Ser	107	3.2 %	UAU	Tyr	146	4.3 %	UGU	Cys	89	2.6 %
UUC	Phe	40	1.2 %	UCC	Ser	22	0.7 %	UAC	Tyr	17	0.5 %	UGC	Cys	15	0.4 %
UUA	Leu	125	3.7 %	UCA	Ser	26	0.8 %	UAA	-	0	0 %	UGA	Trp	33	1.0 %
UUG	Leu	236	7.0 %	UCG	Ser	36	1.1 %	UAG	stop	12	0.4 %	UGG	Trp	80	2.4 %
CUU	Leu	107	3.2 %	CCU	Pro	43	1.3 %	CAU	His	49	1.5 %	CGU	Arg	47	1.4 %
CUC	Leu	14	0.4 %	CCC	Pro	19	0.6 %	CAC	His	7	0.2 %	CGC	Arg	4	0.1 %
CUA	Leu	26	0.8 %	CCA	Pro	7	0.2 %	CAA	Gln	12	0.4 %	CGA	Arg	3	0.1 %
CUG	Leu	41	1.2 %	CCG	Pro	21	0.6 %	CAG	Gln	21	0.6 %	CGG	Arg	23	0.7 %
AUU	Ile	103	3.1 %	ACU	Thr	60	1.8 %	AAU	Asn	44	1.3 %	AGU	Ser	72	2.1 %
AUC	Ile	18	0.5 %	ACC	Thr	11	0.3 %	AAC	Asn	7	0.2 %	AGC	Ser	15	0.4 %
AUA	Met	55	1.6 %	ACA	Thr	8	0.2 %	AAA	Asn	17	0.5 %	AGA	Ser	15	0.4 %
AUG	Met	101	3.0 %	ACG	Thr	16	0.5 %	AAG	Lys	44	1.3 %	AGG	Ser	47	1.4 %
GUU	Val	215	6.4 %	GCU	Ala	21	0.6 %	GAU	Asp	69	2.0 %	GGU	Gly	133	3.9 %
GUC	Val	15	0.4 %	GCC	Ala	76	2.3 %	GAC	Asp	3	0.1 %	GGC	Gly	35	1.0 %
GUA	Val	39	1.2 %	GCA	Ala	5	0.2 %	GAA	Glu	6	0.2 %	GGA	Gly	28	0.8 %
GUG	Val	138	4.1 %	GCG	Ala	36	1.1 %	GAG	Glu	71	2.1 %	GGG	Gly	105	3.1 %

Для каждого кодона указаны соответствующая ему аминокислота и частота использования этого кодона в генах мтДНК (число использований и соответствующая доля в процентах). Подчеркнуты отличия от стандартного генетического кода

### ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА *O. FELINEUS*

Митохондриальный геном *O. felineus* представляет собой кольцевую молекулу ДНК длиной 14277 нт и, таким образом, является самым коротким из известных на данный момент митохондриальных геномов трематод [12]. Анализ последовательности генома выявил наличие типичных митохондриальных генов: 12 белок-кодирующих генов (отсутствует ген одной из субъединиц АТФазы, *atp8*), 22 гена тРНК и 2 гена рРНК (табл. 1).

Все гены транскрибируются с одной цепи, как и у других плоских червей (рис. 1). Порядок расположения генов идентичен с таковым у *F. hepatica* [13]. Гены *nd4L* и *nd4* перекрываются на 40 пн по различным рамкам считывания.

Все известные митохондриальные геномы плоских червей, за исключением генома *P. westermani*, являются А/Т-богатыми. Митохондриальный геном *O. felineus* содержит 60 % А + Т; кроме того, кодирующая цепь обогащена тиминном (43 %) по сравнению с аденином (17 %) и гуанином (28 %) по сравнению с цитозином (12 %). Нуклеотидный состав варьирует в различных частях генома, в особенности в третьих позициях кодонов белок-кодирующих генов, где цитозин составляет всего 8 %. Кодоны, оканчивающиеся на Т и G, встречаются значительно чаще, чем оканчивающиеся на А и С.

Самыми часто встречающимися кодонами являются ТТТ, ГТТ и ТТГ. Кодон ТТТ составляет почти 10 % от числа всех кодонов, в то время как все кодоны, составленные из А и С, занимают всего около 2 % (табл. 2). Как и в других митохондриальных геномах трематод, старт-кодонами являются АТГ и GTG, а стоп-кодоном – TAG. Кодон TGA используется для кодирования триптофана, а TAA не используется вообще. Укороченных стоп-кодонов в митохондриальном геноме *O. felineus* обнаружено не было (табл. 1).

Длина генов тРНК у *O. felineus* варьирует от 59 до 72 нуклеотидов. Большая часть генов тРНК организованы в кластеры, включающие до пяти генов. Для 19 из 22 тРНК можно теоретически реконструировать типичную структуру «листа клевера». Как и у всех трематод, DHU-петля отсутствует у тРНК-Ser(AGN). DHU-петля отсутствует и у тРНК-Cys, что характерно также для некоторых шистосом [14], а для гена тРНК-Ser(UCN) возможно считать две альтернативные структуры, с DHU-петлей и без нее (рис. 2).

Кроме коротких межгенных промежутков, в геномах плоских червей имеются длинные некодирующие районы, которые, как считается, содержат последовательности, необходимые для инициации репликации и транскрипции мтДНК. Как и у *F. hepatica*, расположенный между генами



Табл. 3. Однонуклеотидные полиморфизмы, обнаруженные в митогеноме *O. felineus*

№	Положение в мтДНК и аллель, определенная «санджеровским» секвенированием	Частоты аллелей в последовательностях, определенных при пиросеквенировании	Ген	Заменяемый кодон	Аминокислотная замена	
1	361	T	C-3 / T-27	cox3	tgg/cgg	W/R
2	1068	C	T-3 / C-25	cytB	tac/tat	-
3	1195	C	T-8 / C-17	cytB	cta/tta	-
4	1300	C	T-4 / C-23	cytB	ctg/ttg	-
5	1524	A	A-1 / G-28	cytB	caa/cag	-
6	1599	T	C-5 / T-28	cytB	ctg/ccg	L/P
7	1860	C	C-1 / T-24	cytB	ggc/ggt	-
8	1899	C	T-4 / C-24	nd4L	cct/tct	P/S
9	2025	T	C-4 / T-28	nd4L	tta/cta	-
10	2034	C	T-4 / C-28	nd4L	cgg/tgg	R/W
11	2039	C	T-4 / C-28	nd4L	ggc/ggt	-
12	3104	T	C-5 / T-19	nd4	ttg/ctg	-
13	3228	C	T-3 / C-25	nd4	gcg/gtg	A/V
14	3245	T	C-3 / T-27	nd4	tta/cta	-
15	3260	C	T-3 / C-26	nd4	ctg/ttg	-
16	3674	A	G-6 / A-28	atp6	aat/agt	N/S
17	3827	G	G-0 / A-39	atp6	ggt/gat	G/D
18	3915	A	A-0 / G-34	atp6	cta/ctg	-
19	3921	T	C-6 / T-28	atp6	tat/tac	-
20	3935	T	T-0 / C-35	atp6	gtg/gcg	V/A
21	4507	A	A-1 / G-20	nd2	ata/gta	I/V
22	4548	C	T-11 / C-14	nd2	agc/agt	-
23	4707	T	T-0 / C-33	nd2	tct/tcc	-
24	4710	T	T-0 / G-33	nd2	cct/ccg	-
25	5390	T	T-0 / A-36	nd1	aat/aaa	N/K
26	5684	C	C-2 / T-21	nd1	gcc/gct	-
27	6158	C	T-5 / C-32	-	-	-
28	6175	C	T-5 / C-33	tRNA-Asn	-	-
29	6314	T	C-3 / T-24	tRNA-Ile	-	-
30	6650	A	A-2 / G-30	nad3	gta/gtg	-
31	6810	C	T-4 / C-30	-	-	-
32	7865	A	A-0 / G-31	cox1	tca/tcg	-
33	8669	A	G-4 / A-27	16S rRNA	-	-
34	10692	T	C-3 / T-17	cox2	ata/aca	I/T
35	11152	A	G-8 / A-23	nd6	cca/ccg	-
36	11880	C	T-4 / C-36	tRNA-Arg	-	-
37	12186	G	G-1 / C-25	nd5	gtt/ctt	V/L
38	12326	T	A-3 / T-24	nd5	cgt/cga	-
39	12533	G	A-5 / G-22	nd5	gtg/gta	-
40	13403	G	A-4 / G-23	nd5	tcg/tea	-
41	13589	G	G-0 / A-11	-	-	-
42	13993	C	C-0 / T-30	-	-	-
43	14001	G	G-0 / A-18	-	-	-
44	14007	C	C-0 / T-8	-	-	-
45	14212	C	C-0 / T-9	-	-	-

*tRNA-Glu* и *cox3* некодирующий район *O. felineus* разделен на две части геном тРНК-Gly. Эти некодирующие районы не содержат, в отличие от некодирующих районов митохондриальных геномов других плоских червей, ни длинных tandemных повторов, ни последовательностей, способных формировать длинные шпильчатые структуры.

В некодирующем регионе *O. felineus* была обнаружена открытая рамка считывания длиной 402 п.н. Поиск сходных последовательностей в базах данных биологических последовательностей при использовании как нуклеотидной, так и аминокислотной последовательностей результатов не дал. Довольно длинные открытые рамки считывания для пептидов без сходства с известными белками были так-

же обнаружены в «некодирующих» районах мтДНК у других представителей плоских червей: *F. hepatica*, цестоды *Hymenolepis diminuta* [15] и моногенеи *Microcotyle sebastis* [16]. Возможно, данные рамки считывания кодируют функциональные белки, однако, это требует дополнительных экспериментальных доказательств.

Некодирующий участок мтДНК может быть использован для разработки методов специфической молекулярной идентификации *O. felineus*. Так, уровни гомологии нуклеотидных последовательностей мтДНК *O. felineus* и двух родственных трематод, для которых известны полные последовательности митохондриальных геномов, *S. sinensis* (FJ381664) и *F. hepatica* (AF216697), составляют

соответственно 78 % и 64 %. Однако последовательности некодирующих районов, расположенных между *tRNA-Glu* и *cox3*, у этих трех трематод не имеют значимой гомологии ни между собой, ни с другими представленными в GenBank последовательностями.

### ОДНОНУКЛЕОТИДНЫЕ ПОЛИМОРФИЗМЫ В мтДНК *O. FELINEUS*

В ходе определения нуклеотидной последовательности мтДНК методом пиросеквенирования каждый нуклеотид генома был «прочтен» в среднем 30 раз в результате секвенирования клонально-амплифицированных индивидуальных фрагментов молекул мтДНК *O. felineus*. Сравнение последовательностей индивидуальных чтений с консенсусной позволяет идентифицировать однонуклеотидные полиморфизмы (SNP), присутствующие в различных молекулах мтДНК в одном организме. Поскольку «сэнджерское» секвенирование и пиросеквенирование проводились для ДНК, выделенной из нескольких особей *O. felineus*, сравнение соответствующих последовательностей мтДНК позволяет получить приблизительную оценку частот встречаемости гаплотипов по каждому SNP.

Данные о 45 детектированных SNP приведены в табл. 3. Большая часть SNP, как в мтДНК других животных и человека [17], представляют собой замены Т:С и А:G (соответствует Т:С по комплементарной цепи), в основном не приводящие к аминокислотным заменам в белковых продуктах соответствующих генов. Отметим, что несколько SNP выглядели специфическими для последовательности мтДНК, расшифрованной одной из двух технологий, и не встречались (или встречались с низкой частотой) в другой. Вероятно, различия в аллельных частотах являются отражением искажений, характерных для основанных на ПЦР методов амплификации и секвенирования гетерогенной смеси ампликонов, в то время как соотношение аллелей по SNP, полученное при пиро-

секвенировании индивидуальных фрагментов, должно быть более близким к реальному.

В будущем данные о специфических SNP и частотах известных SNP в мтДНК могут быть использованы в качестве молекулярных маркеров при исследовании структур природных популяций *O. felineus* и анализе путей распространения патогена в окружающей среде и человеческих популяциях.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе мы представили результаты определения полной нуклеотидной последовательности мтДНК плоского червя *O. felineus* двумя методами. В первом из них последовательности мтДНК были специфически амплифицированы и секвенированы методом капиллярного электрофореза. При использовании второго подхода, параллельного пиросеквенирования, образец геномной ДНК животных был просеквенирован без какого-либо предварительного обогащения последовательностями мтДНК, в результате чего была определена *de novo* полная последовательность митохондриального генома. Метод пиросеквенирования на геномном анализаторе GS FLX может быть использован для быстрой расшифровки митохондриальных геномов животных и идентификации полиморфизмов. Данные о нуклеотидной последовательности митохондриального генома *O. felineus* могут быть использованы для разработки методов молекулярной диагностики описторхоза. ●

*Выполненные работы были поддержаны программой «Геномика, протеомика, биоинформатика» СО РАН в ИЦиГ СО РАН и Федеральным агентством по науке и инновациям (ГК № 02.552.11.7045) в Центре «Биоинженерия» РАН. Авторы выражают благодарность сотрудникам ИСиЖ СО РАН Н. И. Юрловой и К. П. Федорову за помощь в идентификации *O. felineus*.*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Берг С.А. Биология возбудителя описторхоза. М: Товарищество научных изданий КМК, 2005.
- Ромашов Б.В., Ромашов В.А., Семенов В.А., Филимонова Л.В. Описторхоз в бассейне верхнего Дона (Воронежская область): фауна описторхид, эколого-биологические закономерности циркуляции и очаговость описторхозидозов. Воронеж: Воронежский государственный университет, 2003.
- Катохин А.В., Шеховцов С.В., Konkow S., Юрлова Н.И., Сербина Е.А., Водяницкая С.Н., Федоров К.П., Локтев В.В., Муратов И.В., Ohyama F., Махнева Т.В., Пельтек С.Е., Мордвинов В.А. // Оценка генетических отличий *Opisthorchis felineus* от *Opisthorchis viverrini* и *Clonorchis sinensis* по ITS2- и COI-последовательностям. Доклады Академии наук. 2008. Т. 421. № 4. С. 549-552.
- Kang S., Sultana T., Loktev V.B., Wongratancheeewin S., Sohn W.-M., Eom K.S. and Park J.-K. // Molecular identification and phylogenetic analysis of nuclear rDNA sequences among three opisthorchid liver fluke species (Opisthorchiidae: Trematoda). *Parasitology Research*, 2008. V. 57. P. 191-197
- Saibuntha W., Sithithaworn P., Wongkham S., Laha T., Chilton N.B., Petney T.N., Barton M. and Andrews R.H. // Mitochondrial DNA sequence variation among geographical isolates of *Opisthorchis viverrini* in Thailand and Lao PDR, and phylogenetic relationships with other trematodes. *Parasitology*. 2008. V. 135. P. 1479-1486.
- Ballard J.W.O. and Whitlock M.C. // The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*. 2004. V. 13. P. 729-744.
- Маниатис Т., Фрич Э., Самбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М: Мир, 1984.
- Telford M.J., Herniou E.A., Russel R.B. and Littlewood D.T.J. // Changes in mitochondrial genetic codes as phylogenetic characters: Two examples from the flatworms. *Proceedings of the National Academic Society*. 2000. V. 97. P. 11359-11364.
- Lowe T.M., Eddy S.R. // tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Research*. 1997. V. 25. P. 955-964.
- Anderson S., Bankier A.T., Barrell B.G., de Bruijn M.H., Coulson A.R., Drouin J., Eperon I.C., Nierlich D.P., Roe B.A., Sanger F., Schreier P.H., Smith A.J., Staden R., Young I.G. // Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 1981. V. 290. 457-465.
- Margulies M., Egholm M., Altman W.E., Attiya S., Bader J.S., Bemben L.A., Berka J., Braverman M.S., Chen Y.J., Chen Z., Dewell S.B., Du L., Fierro J.M., Gomes X.V., Godwin B.C., He W., Helgesen S., Ho C.H., Irzyk G.P., Jando S.C., Alenquer M.L., Jarvie T.P., Jirage K.B., Kim J.B., Knight J.R., Lanza J.R., Leamon J.H., Lefkowitz S.M., Lei M., Li J., Lohman K.L., Lu H., Makhijani V.B., McDade K.E., McKenna M.P., Myers E.W., Nickerson E., Nobile J.R., Plant R., Puc B.P., Ronan M.T., Roth G.T., Sarkis G.J., Simons J.F., Simpson J.W., Srinivasan M., Tartaro K.R., Tomas A., Vogt K.A., Volkmer G.A., Wang S.H., Wang Y., Weiner M.P., Yu P., Begley R.F., Rothberg J.M. // Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*. 2005. V. 437. P. 376-380.
- Le T.H., Blair D. and McManus D.P. // Mitochondrial genomes of parasitic flatworms. *Trends in Parasitology*. 2002. V. 18. P. 206-213.
- Le T.H., Blair D. and McManus D.P. // Complete DNA sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the liver fluke, *Fasciola hepatica* L. (Platyhelminthes; Trematoda). *Parasitology*. 2001. V. 123. P. 609-621.
- Littlewood D.T.J., Lockyer A.E., Webster B.L., Johnston D.A. and Le T.H. // The complete mitochondrial genomes of *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma spindale* and the evolutionary history of mitochondrial genome changes among parasitic flatworms. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2006. V. 39. P. 452-467.
- von Nickisch-Roseneck M., Brown W.M. and Boore J.L. // Complete Sequence of the Mitochondrial Genome of the Tapeworm *Hymenolepis diminuta*: Gene Arrangements Indicate that Platyhelminths Are Eutrochozoans. *Molecular Biology and Evolution*. 2001. V. 18. P. 721-730.
- Park J., Kim K., Kang S., Kim W., Eom K. S. and Littlewood D.T.J. // A common origin of complex life cycles in parasitic flatworms: evidence from the complete mitochondrial genome of *Microcotyle sebastis* (Monogenea: Platyhelminthes). *BMC Evolutionary Biology*. 2007. V. 7.
- MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database. <http://www.mitomap.org>, 2007.

УДК 576.315.42

# В эритроидных клетках кур протяженный фрагмент хромосомы 14, включающий кластер альфа-глобиновых генов, организован в микропетли

Е. С. Филоненко<sup>#</sup>, А. А. Гаврилов, С. В. Разин, О. В. Яровая  
 Институт биологии гена РАН  
<sup>#</sup> e-mail: len\_soap@mail.ru

**РЕФЕРАТ** Ранее было продемонстрировано, что активация транскрипции тканеспецифичных генов при клеточной дифференцировке коррелирует с пространственной реорганизацией геномных доменов, в границах которых расположены эти гены. Эта реорганизация заключается в перемещении всего домена, содержащего один или несколько активно транскрибирующихся генов, к ядерному матриксу. Однако оставалось неясным, действительно ли в такой ситуации протяженные геномные области равномерно прикрепляются к ядерному матриксу. Мы исследовали характер прикрепления к ядерному матриксу в эритроидных и лимфоидных клетках 220 т.п.н. геномного фрагмента, содержащего кластер  $\alpha$ -глобиновых генов и окружающие его гены «домашнего хозяйства». Полученные результаты позволяют утверждать, что в эритроидных клетках часть этого фрагмента, включающая в себя домен  $\alpha$ -глобиновых генов, организована в микропетли, которые при картировании участков прикрепления ДНК к ядерному матриксу с низким разрешением не детектируются.

В хромосомах эукариот ДНК организована в петли, основания которых фиксированы на ядерном матриксе [1, 2]. Участки прикрепления ДНК к ядерному матриксу неоднородны по своей природе. Выделяют конститутивные (стабильные, структурные) участки прикрепления, которые существуют во всех тканях организма, и факультативные (динамические, функциональные, тканеспецифичные) участки прикрепления, характерные для клеток определенного типа, либо стадии дифференцировки [2-5]. Целью настоящей работы было изучение пространственной организации 220 т.п.н. района куриной хромосомы 14, который включает кластер тканеспецифичных  $\alpha$ -глобиновых генов и ряд «генов домашнего хозяйства» (рис. 1) [6]. С целью дискриминации различных типов взаимодействий ДНК с ядерным матриксом проводилось параллельное изучение пространственной организации домена

в эритроидных и неэритроидных клетках. В качестве объекта были выбраны куриные эритробласты линии HD3 (клон А6 линии LSCC) [7] и куриные лимфоидные клетки линии DT40 (CRL-2111, ATCC). Ранее методом гибридизации *in situ* с флуоресцентными ВАС-пробами к исследуемой области генома нами было продемонстрировано, что в лимфоидных клетках эта область генома организована в несколько петель, закрепленных на ядерном матриксе [8]. В эритроидных клетках пространственная организация той же геномной области оказалась принципиально иной. Большая часть локуса была коллапсирована на структурах ядерного матрикса и выявлялась в виде точечного сигнала при гибридизации протяженной пробы с препаратом экстрагированных 2M NaCl ядер (т.е. с ядерными «гало») [8]. Результаты, полученные рядом авторов, позволяют полагать, что активно транскрибирующиеся тканеспецифичные

гены ассоциированы с ядерным матриксом [9-11]. В связи с этим логично было предположить, что наблюдаемый нами коллапс петли хроматина в куриных эритроблестах является следствием активации тканеспецифичных генов в ходе эритроидной дифференцировки. Для уточнения топографии взаимодействий ДНК с ядерным матриксом в изучаемой геномной области нами использовался следующий подход: в исследуемой области были выбраны короткие тест-фрагменты, отстоящие друг от друга на 5 т.п.н., и методом полуколичественного ПЦР-анализа оценивалась представленность этих фрагментов в препаратах прикрепленной к матриксу ДНК (рис. 1). Последовательности праймеров, использованных для ПЦР-анализа, представлены в табл. 1. Препараты ДНК ядерного матрикса получали, как описано в [11-12]. Количество эндонуклеазы подбирали таким образом, чтобы средний размер фрагментов прикрепленной к ядерному матриксу ДНК составлял 5 т.п.н. В качестве

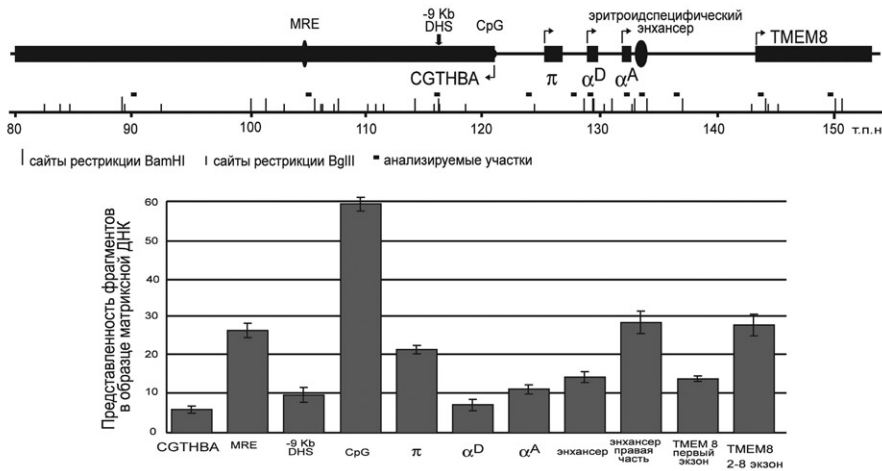


Рис. 1. Картирование участков прикрепления ДНК к ядерному матриксу в границах 220 т.п.н. локуса хромосомы 14 кур, включающего кластер альфа-глобиновых генов. В верхней части рисунка показана схема изучаемой геномной области. На схеме: RHBDF – ген, кодирующий эпидермальный фактор роста; MPG – 3- ген, кодирующий метиладенин-ДНК-гликозилазу; CGTHBA – ген домашнего хозяйства с неизвестной функцией; CpG – CpG островок, содержащий участок начала репликации ДНК; π – эмбриональный α-глобиновый ген; α<sup>A</sup> и α<sup>D</sup> «взрослые» α-глобиновые гены; TMEM8 – ген, кодирующий трансмембранный белок 8; P15 – ген, кодирующий белок L 28 митохондриальных хромосом; Axin1 – ген, кодирующий аксин. т.п.н. – тысячи пар нуклеотидов. В нижней части рисунка показаны результаты картирования участков прикрепления ДНК к ядерному матриксу. Черный прямоугольник показывает затененную область, которая представляется целиком прикрепленной к ядерному матриксу в клетках HD3

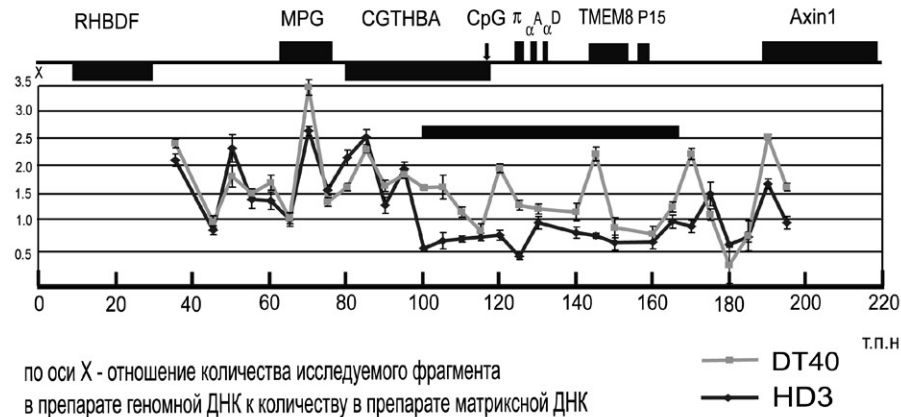


Рис. 2. Анализ представленности в ядерном матриксе из клеток HD3 фрагментов ДНК, картирующихся в границах тканеспецифичных генов и различных регуляторных элементов. Позиции тест-фрагментов показаны черными линиями под картой изучаемой области. Участки расщепления ДНК рестриктазами Bam HI и Bgl II показаны соответственно длинными и короткими вертикальными черточками над шкалой расстояний. Столбцы на диаграмме в нижней части рисунка отражают относительную представленность тест-фрагментов в препаратах прилежащей к ядерному матриксу ДНК

Табл. 1. Праймеры для картирования участков прикрепления ДНК к ядерному матриксу с использованием техники полуколичественной ПЦР

название праймера	последовательность ДНК
01 dir	5' CTCATTGGCCAGCGAGATAT 3'
01 rev	5' GCCTCGATGGTGCAGTAAGC 3'
02 dir	5' CCCTGTAGGCTGCAACCCG 3'
02 rev	5' ACAGTCCCTTTTCCATCACC 3'
03 dir	5' CATCTGTGCATCCGTTCTAC 3'
03 rev	5' TCTTCTAAAGTGCCACCATC 3'
04 dir	5' CCCTATTTTCAGGGTTATTA 3'
04 rev	5' AAATGTAAGCGATTGGTAG 3'
05 dir	5' GCGTGGAGTAGTTCAGGTAA 3'
05 rev	5' GACACTGAGTCCACCAAAG 3'
06 dir	5' CACTGTGAATGCAGGTAA 3'
06 rev	5' TCTTCTAAGATTGCCGTGTT 3'
07 dir	5' GGCTGCATAGCATTACTTTC 3'
07 rev	5' GTAGGACTTAACCAACAGT 3'
08 dir	5' TCCATGTAAGGAGCAGATT 3'
08 rev	5' GTGTTTTGGGAGCAGTAGT 3'
09 dir	5' TCATTCTGCCTGACCACTTT 3'
09 rev	5' CCTCCTCAGAGCCAACCAA 3'
10 dir	5' GGAAACTCAGGGCTCACAAT 3'
10 rev	5' GCAAGGCCAAGAAGCAATAT 3'
11 dir	5' AAGCACTCAGAAGCACAACA 3'
11 rev	5' GCCAGACTTACGAAATCAA 3'
12 dir	5' CACAGGACTATCCAGGTATG 3'
12 rev	5' AGGGCTGTCAGTCTTCAGTA 3'
13 dir	5' GCTGCTTACTCTGTTCTCA 3'
13 rev	5' GCCTTGTCTCTTCCCTACC 3'
14 dir	5' CTGCTCATGTTTGTGTTAAG 3'
14 rev	5' CAAAGTCCCAAAAAGCTATAA 3'
15 dir	5' ATTACCAAGCCTACTTCATT 3'
15 rev	5' GTTGAGACTTTGATCTGTGG 3'
16 dir	5' CAGAGCTCAATTCCATAGG 3'
16 rev	5' TTATCTGGGGTACCTGCAG 3'
17 dir	5' TGTTCCTCGTATCTCGTCAG 3'
17 rev	5' TCACCCATATCCACTCCGT 3'
18 dir	5' GCAGACTCTTAGATTGGCAT 3'
18 rev	5' CTCAGTCAGAACAGAGGAAA 3'
19 dir	5' GTGAAAAAATCCACTGTAAA 3'
19 rev	5' ATCTAAAGCCAAATGAAGAAA 3'
20 dir	5' TATCCCTCCCTGCCTTACC 3'
20 rev	5' AGCGAGCACTACCTCTGTG 3'
21 dir	5' GCCCTTCGTGCTCTGATTT 3'
21 rev	5' ATTCCAGCAGCTTCTCTCC 3'
22 dir	5' ACCTCATCACCCCTTCCACAT 3'
22 rev	5' TGCCACAAACCATCGTCTCA 3'
23 dir	5' TCAGGAGCACCACCTTTAGA 3'
23 rev	5' TTGTGGCAGCACTTCGGTAA 3'
24 dir	5' GGAGTGTACTTCTCTTTGAT 3'
24 rev	5' TGGTAATGTTCTACTGGGT 3'
25 dir	5' AAGCGTGGTGCATGTGAAA 3'
25 rev	5' TGAGTCTGTGATGGGTCTG 3'
26 dir	5' TCCCTAACAAATGTGAGTTCC 3'
26 rev	5' CTGCTGCATACAGTCTTGG 3'
27 dir	5' GTGCTTATCTGAGCCCTTCC 3'
27 rev	5' CAGTATCACCCAGCTCCACA 3'
28 dir	5' TTCAAATCACTTACGCTACA 3'
28 rev	5' CTGGTTATCTGCCTACTCTG 3'
29 dir	5' TGGATGTGTACAGTGTGTA 3'
29 rev	5' TGCCGTGAAAGAGTTGGAGT 3'
30 dir	5' CAGTCTATCTCCCGTTGCTA 3'
30 rev	5' AAACCTTACGGCTGGTCTCA 3'

контроля использовали геномную ДНК, где все исследуемые фрагменты представлены в одинаковой степени. Полученные результаты представлены на *рис. 1* в виде отношения содержания исследуемых фрагментов в препаратах геномной ДНК к содержанию этих фрагментов в препаратах прилежащей к ядерному матриксу ДНК. При таком способе представления результатов прикрепленные к ядерному матриксу фрагменты ДНК располагаются близко к оси абсцисс, тогда как петли ДНК имеют вид пиков. В качестве положительного контроля был использован фрагмент кластера  $\alpha$ -глобиновых генов, содержащий CpG островок, который, как было продемонстрировано ранее, перманентно прикреплен к ядерному матриксу [5]. Результаты показали, что в лимфоидных клетках DT40 участки прикрепления ДНК к ядерному матриксу распределены относительно регулярно в пределах всей исследуемой области и разделяются не связанными с ядерным матриксом фрагментами ДНК (*рис. 1*). Среднее расстояние между участками прикрепления или, иными словами, размер петля ДНК, составляет 20–30 т.п.н. Это хорошо согласуется с предшествующими наблюдениями, где с использованием принципиально иного методического подхода было показано, что в клетках DT40 данная геномная область организована в короткие петли [8]. В эритроидных клетках большая часть исследуемой геномной области оказалась предпочтительно представлена в препаратах прилежащей к ядерному матриксу ДНК. Анализ полученных результатов (*рис. 1*) позволяет заключить, что протяженный фрагмент генома с координатами от 100 до 170 т.п.н. на карте, показанной на *рис. 1*, целиком прикреплен к ядерному матриксу. Действительно, в границах этого фрагмента отсутствует чередование прикрепленных и не прикрепленных к ядерному матриксу фрагментов ДНК, которое хорошо просматривается во фланкирующих областях. В пределах прикрепленного к ядерному матриксу протяженного геномного фрагмента локализируются домен  $\alpha$ -глобиновых генов, а также гены P15, TMEM8 и часть гена CGTHBA. Участок с координатами 35–100 т.п.н. (*рис. 1*) организован сходным образом в клетках HD3 и DT40. Эта область содержит гены домашнего хозяйства, которые экспрессируются на относительно низком уровне как в эритроидных, так и в лимфоидных клетках [13]. Обсуждавшиеся выше результаты коррелируют с результатами предшествующей работы, в которой пространственная организация домена  $\alpha$ -глобиновых генов кур и фланкирующих его геномных областей изучалась с использованием гало-FISH [8]. Неясным, однако, остается вопрос, действительно ли область с координатами 100–170 т.п.н. (*рис. 1*) прикреплена к ядерному матриксу на всем своем протяжении. Альтернативная модель заключается в том, что эта область организована в микропетли, которые не могли быть обнаружены при нашем анализе в силу того, что тест-фрагменты располагались на расстояниях 5 т.п.н. друг от друга. Для проверки данной модели было проведено подробное картирование участков прикрепления ДНК к ядерному матриксу в ряде функционально значимых сегментов изучаемой геномной области. Эксперименты проводили на клетках HD3. Препараты прилежащей к ядерному матриксу ДНК получали посредством отщепления дистальных частей петель ДНК рестриктазами *Vam* HI и *Vgl* II. Далее методом ПЦР в реальном времени проводили ана-

лиз прикрепления к ядерному матриксу фрагментов ДНК, включающих эритроид-специфичные гены и регуляторные элементы (*рис. 2*, схема в верхней части рисунка). Последовательности праймеров и TaqMan проб приведены в *табл. 2*. Полученные данные (диаграмма на *рис. 2*) продемонстрировали, что в прилежащей к ядерному матриксу ДНК представленность исследуемых фрагментов ДНК различна. Лучше всех представлены фрагменты ДНК, содержащие расположенный перед кластером альфа-глобиновых генов CpG островок, ORF TMEM8, эмбриональный

Табл. 2. Праймеры и TaqMan пробы для картирования участков прикрепления ДНК к ядерному матриксу с использованием техники ПЦР в реальном времени

название праймера	последовательность
TMEM8 2-8 экзон probe	5' FAM CACTGTAACT(BHQ1)TTGTGTTTTGTGCGCTGTAGC 3'
TMEM8 2-8 экзон dir	5' AGGCTCCAGCAGTGAGATCC 3'
TMEM8 2-8 экзон rev	5' GACCTGGGCATACAAGATAAGC 3'
TMEM 1-й экзон probe	5' FAM CTCACAAGCCTCACT(BHQ1)GTGAAGCTCTCTC 3'
TMEM 1-й экзон dir	5' AGGAGCTATCAAATGCAGTGTCT 3'
TMEM 1-й экзон rev	5' AGGTACAGAAAGGTCCAGAAACA 3'
DHS -9 probe	5' FAM ATTTGATCCTAGATT(BHQ1)GCCAGTGAATTGAA 3'
DHS -9 dir	5' GCGATATTGAATGTTCTCTAGGA 3'
DHS -9 rev	5' GCTTTGACTGGATGACTGCC 3'
MRE probe	5' FAM AAGTGTGACT(BHQ1)CATGGTTTGCTAGTTTGC 3'
MRE dir	5' GCTGCCTCATGTTTGTAAAGATA 3'
MRE rev	5' GTGACTCAGCAAGAACAGCAGA 3'
CGTHBA probe	5' FAM TGAACACAGCAGAAGCT(BHQ1)GGAAGGCAA 3'
CGTHBA dir	5' CACCAGCATGACTAGGTCTTTG 3'
CGTHBA rev	5' ATCAGGACACATGGTTGGACA 3'
CpG probe	5' FAM CCACAAAT(BHQ1)CAAAGCGATGCGGTAT 3'
CpG dir	5' TTCACAGCACAAGGGATAACT 3'
CpG rev	5' GATCTGAGCTGCATCACTAAATG 3'
alphaD probe	5' FAM AACGCCGT(BHQ1)GAAGAACGTGGACAAC 3'
alphaD dir	5' TGTTCACCACCTATCCCCA 3'
alphaD rev	5' GTTGCTCAGCTCAGCCATG 3'
alphaA probe	5' FAM AGGTAGGTGT(BHQ1)CCTTCTCTGTCTCTCCG 3'
alphaA dir	5' AGGGCATCTTACCACAAAATC 3'
alphaA rev	5' GTGGAGCACAGTGAGTCAGG 3'
enh probe	5' FAM AAGTGCTGATGGTTCTCT(BHQ1)GTTGGAGTGT 3'
enh dir	5' GCAGACAGGCTGGAGAAGAC 3'
enh rev	5' GGTTCATAGCCCCAAGAGCAG 3'
enh right probe	5' FAM TTCAGAGAGTAAGTTCTCT(BHQ1)ATGCGTTGCCT 3'
enh right dir	5' TTAGGCTGTGCTCTCTCAAC 3'
enh right rev	5' AACAGGTCGATAAACAGATGCT 3'
Pi probe	5' FAM ACGCAT(BHQ1)GATCCGCACTTGAATACA 3'
Pi dir	5' GCTCACAGCAGTTTGAAGACCT 3'
Pi rev	5' CAAAAGCCTGGAGGAGAAC 3'

$\alpha$ -глобиновый ген  $\pi$ , удаленный регуляторный элемент домена альфа-глобиновых генов (MRE) и участок, расположенный после (в направлении центромеры) эритроид-специфического энхансера. В то же время сам энхансер, а также глобиновые гены  $\alpha^D$  и  $\alpha^A$ , представлены в прилежащей к ядерному матриксу ДНК на относительно низком уровне. Выявлен и ряд других участков, недопредставленных в прилежащей к ядерному матриксу ДНК: это первый экзон открытой рамки считывания TMEM8, эритроид-специфичный регуляторный элемент, локализованный в участке гиперчувствительности к ДНКазе I на расстоянии 9 т.п.н. перед геном  $\pi$  и часть гена домашнего хозяйства CGTNBA. Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что в эритроидных клетках в границах геномной области с координатами 100-170 т.п.н. (рис. 1) существуют участки, которые не прикреплены к ядерному матриксу. Различный уровень представленности в прилежащей к ядерному матриксу ДНК отдельных фрагментов данной области позволяет полагать, что она организована в микропетли. В связи с малым размером этих петель они не могут

быть выявлены при анализе результатов гибридизации протяженных клонированных фрагментов генома с паратами ядерных «гало». Ранее пространственная организация домена  $\alpha$ -глобиновых генов кур была изучена с использованием метода фиксации конформации хромосомы (3С) [14, 15]. В этих экспериментах было показано, что в пролиферирующих клетках HD3 (в которых глобиновые гены транскрибируются на очень низком уровне) происходит сборка преинициаторного блока регуляторных элементов, который включает MRE, расположенный перед кластером альфа-глобиновых генов CpG островков и промотор гена  $\alpha^D$ . Два из элементов этого регуляторного блока ассоциированы с ядерным матриксом, что может способствовать их взаимодействию. ●

*Данная работа была выполнена при поддержке Президиума РАН (Программа «Молекулярная и клеточная биология») и Российского фонда фундаментальных исследований (гранты 09-04-00059, 08-04-91970-ННИОМ\_а, 08-04-0048а).*

Список литературы:

1. Cook P.R., Brazel I.A., Jost E. // J Cell Sci. 1976. V. 22(2). P. 303-324.
2. Razin S. V. // Bioessays. 1987. V. 6(1). P. 19-23.
3. Jackson D.A., Dolle A., Robertson G. et al. // Cell Biol Int Rep. 1992. V. 16(8). P. 687-696.
4. Razin S., Gromova I. // Bioessays. 1995. V. 17. P. 443-450.
5. Razin S.V., Kekelidze M.G., Lukanidin E.M. et al. // Nucleic Acids Res. 1986. V. 14(20). P. 8189-8207.
6. Borunova V.V., Razin S.V., Iarovaia O.V. // Dokl Biochem Biophys. 2008. V. 421. P. 224-226.
7. Beug H., Von Kirchbach A., Doderlin J. et al. // Cell. 1979. V. 18. P. 375-390.
8. Iarovaia O.V., Borunova V.V., Philonenko E.S. et al. // J Cell Biochem. 2009. V. 106(1). P. 170-178.
9. Jackson D.A., Cook P.R. // EMBO J. 1985. V. 4. P. 919-925.
10. Heng H.H., Goetze S., Ye C.J. // J. Cell Sci. 2004. V. 117. P. 999-1008.
11. Iarovaia O.V., Akopov S.B., Nikolaev L.G. et al. // Nucleic Acids Res. 2005. V. 33(13). P. 4157-4163.
12. Iarovaia O.V., Bystritskiy A., Ravcheev D. et al. // Nucl Acids Res. 2004. V. 32. P. 2079-2086.
13. Flint J., Tufarelli C., Peden J et al. // Hum Mol Genet. 2001. V. 10(4). P. 371-382.
14. Gavrillov A.A., Razin S.V. // Nucleic Acids Res. 2008. V. 36(14). P. 4629-4640.
15. Gavrillov A.A., Razin S.V. // Biochemistry. 2008. V. 73(11). P. 1192-1199.

УДК 611-013.3:576.3

# Получение и характеристика линии эмбриональных стволовых клеток мыши, трансфицированных геном нейротрофического фактора глии, слитым с геном зеленого флуоресцентного белка

Е. Л. Арсеньева<sup>1</sup>, И. В. Кузьмин<sup>1</sup>, Е. С. Мануилова<sup>1</sup>, Е. В. Новосадова<sup>1</sup>, Е. В. Муркин<sup>2</sup>,  
Г. В. Павлова<sup>2</sup>, В. З. Тарантул<sup>1</sup>, И. А. Гривенников<sup>1#</sup>

<sup>1</sup> Институт молекулярной генетики РАН, Москва

<sup>2</sup> Институт биологии гена РАН, Москва

# e-mail: igorag@img.ras.ru

**РЕФЕРАТ** Изучено влияние экспрессии гена нейротрофического фактора глии (*gdnf*) человека на морфологию и пролиферативную активность эмбриональных стволовых (ЭС) клеток мыши линии R1, а также на их способность формировать эмбрионидные тела (ЭТ). Предварительно методом ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией, было показано, что в этой линии ЭС клеток осуществляется экспрессия генов рецепторов для нейротрофического фактора глии RET и GFR $\alpha$ 1. Получена линия ЭС клеток мыши, трансфицированных геном *gdnf* человека, слитым с геном «зеленого» флуоресцентного белка (*gfp*). Наличие экспрессии гена *gdnf* человека в этих клетках показано с помощью Нозерн-гибридизации, а синтез его белкового продукта – иммуноцитохимическим окрашиванием с использованием специфических антител. Показано достоверное торможение образования эмбрионидных тел ЭС клетками, трансфицированными геном *gdnf*. При этом не обнаружено заметного влияния экспрессии гена *gdnf* на морфологию и пролиферативную активность трансфицированных ЭС клеток по сравнению с контрольными.

**Ключевые слова:** эмбриональные стволовые клетки, нейротрофический фактор глии, трансфекция, пролиферация, иммуноцитохимия, эмбрионидные тела.

## ВВЕДЕНИЕ

Нейротрофический фактор глии (GDNF, glial derived neurotrophic factor) относится к семейству GDNF-подобных лигандов (GFL), которое также включает в себя ньюртурин (NRTN), персифин (PSPN) и артемин (ARTN). Все они необходимы для выживания дофаминергических нейронов среднего мозга, а также, за исключением PSPN, периферических сенсорных и симпатических нейронов [12, 14]. Кроме

того, GDNF выполняет ряд важных функций вне нервной системы: он регулирует дифференцировку сперматогониев и необходим для эмбрионального развития почек [14].

Все представители семейства GFL осуществляют свое действие на клетки путем связывания с гетерорецепторным комплексом, содержащим рецептор RET и корцептор GFR $\alpha$  [14]. Специфичность активации рецептора RET в отношении различных факторов семейства GFL зависит

от типа GFR $\alpha$ , имеющегося в клетках. GDNF, NRTN, ARTN и PSPN обладают высокой аффинностью к корцепторам GFR $\alpha$ 1, GFR $\alpha$ 2, GFR $\alpha$ 3 и GFR $\alpha$ 4 соответственно. Связывание GFL с «чужим» GFR $\alpha$  возможно, но с меньшей эффективностью. Было показано, что GDNF специфически повышает выживаемость дофаминергических нейронов эмбрионального среднего мозга крыс, усиливает метаболизм дофамина, а также повышает уровень дифференцировки тирозингидроксилаза-положительных клеток (TH<sup>+</sup>), усиливая рост аксонов, увеличивая размеры тела клетки. Аналогичные эффекты наблюдались и в культуре дофаминергических нейронов среднего мозга крыс [12]. Сходные результаты были получены и на трансгенных линиях дрозофилы. Оказалось, что в линиях дрозофилы, несущих ген *gdnf*, в дифференцирующихся нервных клетках обнаружен выраженный синтез тирозингидроксилазы, а клетки дрозофилы, несущие ген *ngf*, активно продуцировали ацетилхолинэстеразу [2, 3]

Эмбриональные стволовые (ЭС) клетки обладают способностью к самообновлению и дифференцировке в производные всех трех первичных зародышевых листков, как в условиях *in vitro*, так и *in vivo*. Важным является тот факт, что в ходе дифференцировки ЭС клеток последовательность экспрессии тканеспецифических генов соответствует последовательности этих процессов при развитии организма *in vivo* [7].

Способность ЭС клеток дифференцироваться в определенных направлениях в условиях *in vitro* дает возможность изучать на этой модели клеточные и молекулярные механизмы раннего развития, а также получать разные типы донорских клеток для трансплантации. Преимущественная дифференцировка ЭС клеток в определенном направлении достигается только в специфических условиях культивирования [9], после воздействия экзогенных факторов роста и дифференцировки [7], путем их генетических модификаций [1, 10, 11, 13]. Первые работы по исследованию направленной дифференцировки ЭС клеток были проведены в основном на ЭС клетках мыши, дифференцировку которых с помощью вышеуказанных подходов удалось направить в гемопоэтические клетки [16], кардиомиоциты [11], инсулин-секретирующие клетки [15], нейроны и клетки глии [4, 6]. Использование метода сочетания генетических манипуляций с культивированием ЭС клеток мыши на фидерном слое стромальных клеток показало значительное увеличение количества дофаминергических нейронов (примерно в 2 раза) в опытном варианте по сравнению с контролем. Результаты опытов по трансплантации таких клеток показали эффективную интеграцию TH<sup>+</sup> клеток в стриатум мыши [10]. Индукция дофаминергической дифференцировки была показана на ЭС клетках человека при условии их культивирования на стромальных клетках P06 [18]. Важным является вопрос сохранения жизнеспособности дофаминергических нейронов при их трансплантации. В работе Buytaert-Hoefen с соавторами [5] было продемонстрировано, что для повышения жизнеспособности дофаминергических нейронов необходимо присутствие такого фактора, как GDNF, или астроцитов из стриатума. Японские исследователи [17], используя методику кокультивирования ЭС клеток приматов на клетках Сертоли, которые секретируют GDNF,

не только обнаружили увеличение количества индуцированных дофаминергических нейронов по сравнению с контролем, но и успешно осуществили трансплантацию этих клеток в стриатум мышей с патологией, сходной с болезнью Паркинсона у человека. ЭС клетки, полученные в результате определенных экспериментальных манипуляций, включая генетические, обладающие определенным типом направленной дифференцировки, могут быть, в перспективе, использованы в клеточной терапии ряда тяжелых заболеваний человека.

В связи с этим представляет существенный интерес изучение ЭС клеток с повышенной экспрессией гена *gdnf*. Для этого в настоящей работе были получены поликлональные культуры ЭС клеток мыши, трансфицированных геном *gdnf* человека, слитым с геном, кодирующим «зеленый» флуоресцентный белок (GFP), и проведена их характеристика.

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

**КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ЭС КЛЕТОК МЫШИ.** Культивирование ЭС клеток проводили при 37 °C и 5 % CO<sub>2</sub> в среде альфа-MEM (Sigma, США), содержащей 15 % фетальной сыворотки коровы (ФСК) (Gibco, США), 0.1 mM 2-меркаптоэтанол, 2 mM L-глутамин, заменимые аминокислоты (Gibco, США), нуклеозиды, витамины и антибиотик гентамицин (20 мкг/мл). В качестве питающего (фидерного) слоя для ЭС клеток использовали первичные фибробласты, полученные от мышей 11-12 дней эмбрионального развития, пролиферация которых была блокирована митомицином C (3 мкг/мл). Ростовой средой для первичной культуры фибробластов служила среда DMEM (Sigma, США), содержащая 10 % ФСК, 2 mM L-глутамин и антибиотик гентамицин (20 мкг/мл). При культивировании ЭС клеток без фидерного слоя в среду добавляли LIF (фактор, ингибирующий лейкемию) (Sigma, США) в конечной концентрации 10 нг/мл, который блокировал спонтанную дифференцировку этих клеток. Пересев клеток со сменой среды осуществляли каждые 3 дня.

Оценка уровня экспрессии генов рецепторов RET и GFR $\alpha$ 1 с помощью полимеразной цепной реакции, сопряженной с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).

Тотальную РНК из недифференцированных ЭС клеток, которые культивировали без фидерного слоя в присутствии LIF, выделяли методом фенол-хлороформной экстракции с использованием набора «YellowSolve» (Clonogen, США), следуя рекомендациям производителя. Процедуру обратной транскрипции проводили с использованием набора фирмы «Силекс» (Россия), согласно протоколу и рекомендациям производителя. Синтез кДНК проводили на 2 мкг тотальной РНК в течение 1 ч при 37 °C в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 0.05 мкг случайных гексапраймеров и 100 ед. обратной транскриптазы MMLV (moloney murine leukemia virus). После остановки реакции (инкубация 10 мин при 70 °C) образцы кДНК хранили при – 20 °C.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в 25 мкл реакционной смеси, состоящей из Taq-буфера, 1.5 mM смеси dNTP, 1.25 ед. «colored» Taq полимеразы («Синтол», Россия), 0.5 мкг образца кДНК и 10 пмоль каждого праймера.



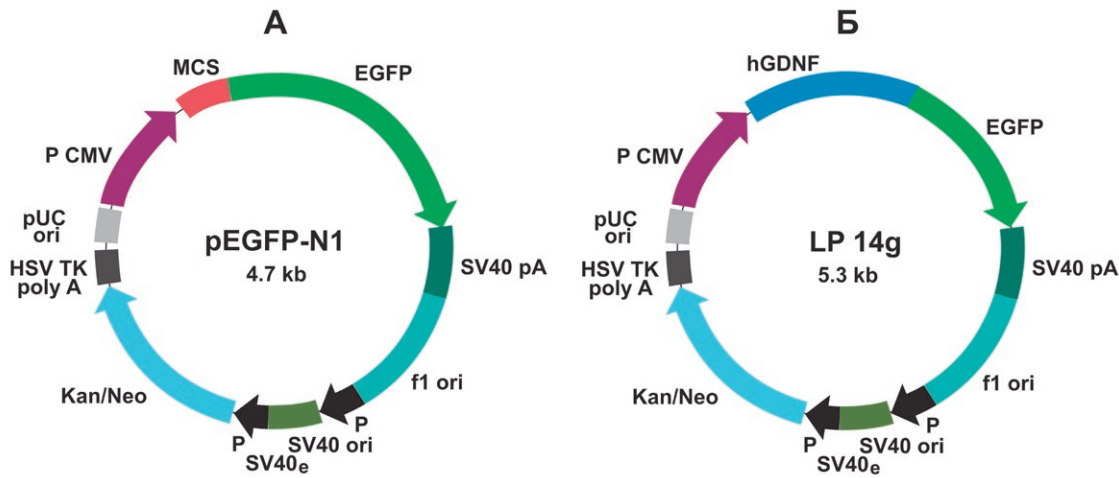


Рис. 1. Схемы строения плазмид *pEGFP-N1* и *LP14g* для трансфекции ЭС клеток. Kan/Neo – ген, обеспечивающий устойчивость к антибиотикам, EGFP – ген «зеленого белка», MCS – последовательность, содержащая сайты рестрикции, hGDNF – вставка гена *gdnf* человека

Ниже приведены последовательности праймеров, использованных в экспериментах [8].

Для гена *RET*: 5'-CCTCCGTGACAGCCGCAAGA-3' (прямой), 5'-GGGAATCCGGCCCTTGCTTT-3' (обратный); размер продукта 297 п.н.

Для гена *GFRα1*: 5'-TCATTGGCAGAAACATCGTAG-3' (прямой), 5'-GCTCAGCTTGCTTTACAGTCC-3' (обратный); размер продукта 285 п.н.

Условия ПЦР были одинаковы для обоих фрагментов: старт: при 52 °С – 5 мин, при 95 °С – 5 мин, далее 35 циклов, включающих при 95 °С 30 сек.; при 68 °С – 30 сек, при 72 °С – 30 сек, при 72 °С – 10 мин. Продукты ПЦР разделяли электрофорезом в 1.5 % агарозном геле с визуализацией с помощью бромистого этидия.

**ГИБРИДИЗАЦИЯ ПО НОЗЕРНУ.** мРНК выделяли из ЭС клеток, используя TRI REAGENT (Sigma, США) по протоколу фирмы-производителя, и разделяли электрофорезом в 1.5 % агарозном геле. Затем мРНК переносили на нейлоновую мембрану. Мечение зонда на ген *gdnf* осуществляли альфа-<sup>32</sup>P АТФ с помощью набора «Random Prime Labelling» (Promega, США) в соответствии с инструкциями фирмы-производителя. Предгибридизацию проводили в гибридационном буфере (X5 SSPE, 0.1 % SDS, X5 р-р Денхардта) в течение 1 ч при 65 °С. Меченый зонд денатурировали 5 мин при 100 °С и добавляли к гибридационному буферу.

Гибридизацию проводили 16-20 ч при 65 °С на водяной бане. Затем фильтр промывали 3 раза по 15 мин в растворе X0.1 SSC, 0.1 % SDS, заворачивали в водонепроницаемую пластиковую пленку и закладывали в кассету с фотопленкой. Экспонировали при -70 °С от 1 до 5 дней.

**РЕКОМБИНАНТНЫЕ ПЛАЗМИДЫ.** Для трансфекции клеток использовались следующие генно-инженерные конструкции. Контрольная плазмида *pEGFP-N1* (рис. 1а) содержала ген *gfp* под промотором цитомегаловируса (CMV) и ген устойчивости к антибиотику неомицину *neo*. Размер плазмиды 4.7 т.п.н. Плазмида *LP14g* (рис. 1б), несущая ген *gdnf* человека, слитый с геном *gfp*, была сконструирована на основе *pEGFP-N1*. Размер плазмиды 5.3 т.п.н.

Структуры плазмид представлены на рис. 1.

**Трансфекция ЭС клеток и селекция.** Введение плазмидной ДНК в ЭС клетки осуществляли с помощью электропорации на приборе СУМ4 (производство Института молекулярной биологии РАН им. В. А. Энгельгардта) при следующих экспериментально подобранных параметрах: продолжительность импульса – 1.5 мс, напряжение 400 В. Для трансфекции 1 000 000 клеток использовали 6-8 мкг плазмидной ДНК. Трансфицированные клетки рассеивали по 300 000 на чашки Петри диаметром 35 мм, покрытые желатином (0.01 %), в 2 мл стандартной среды для ЭС клеток с добавлением LIF (10 нг/мл). Селекцию начинали на вторые сутки после посева добавлением в среду антибиотика G418 (200 мкг/мл). Смену селективной среды проводили каждые 3-4 сут. Поликлональные культуры каждого варианта трансфекции снимали с чашек на 10 день селекции в виде суммарного пула G418-резистентных клонов. Трансфицированные клетки анализировали визуально под микроскопом Аксиоскоп-2 (Carl Zeiss, Германия). Средняя эффективность трансфекции составила около 10<sup>-4</sup>.

**Определение пролиферативной активности ЭС клеток.** Оценку пролиферативной активности клеток контрольной и трансфицированной линий проводили на третьи сутки после посева прямым подсчетом клеток под микроскопом Olympus CKX41 (Olympus, Япония) в камере Горяева.

**Получение эмбрионидных тел.** Для индукции дифференцировки с образованием эмбрионидных тел (ЭТ) ЭС клетки изолировали от фибробластов фидерного слоя. Для этого клетки обрабатывали трипсином, центрифугировали, а затем полученную суспензию инкубировали в чашке Петри (d = 60 мм) (Nunc, Дания) в течение 15-30 мин. За это время основная масса фибробластов прикрепляется ко дну чашки, в то время как ЭС клетки остаются в суспензии. Для формирования ЭТ суспензию ЭС клеток переносили на чашку Петри (d = 35 мм) (Nunc, Дания) в количестве 500 000 или на 96-луночную иммунологическую плашку (по 1000 клеток на лунку) и затем помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор (5 % CO<sub>2</sub>). Подсчет количества образованных ЭТ проводили на 3-4 сут культивирования.

Для формирования единичных ЭТ был применен метод «висячей капли» [7]. Для этого использовали ЭС клетки,

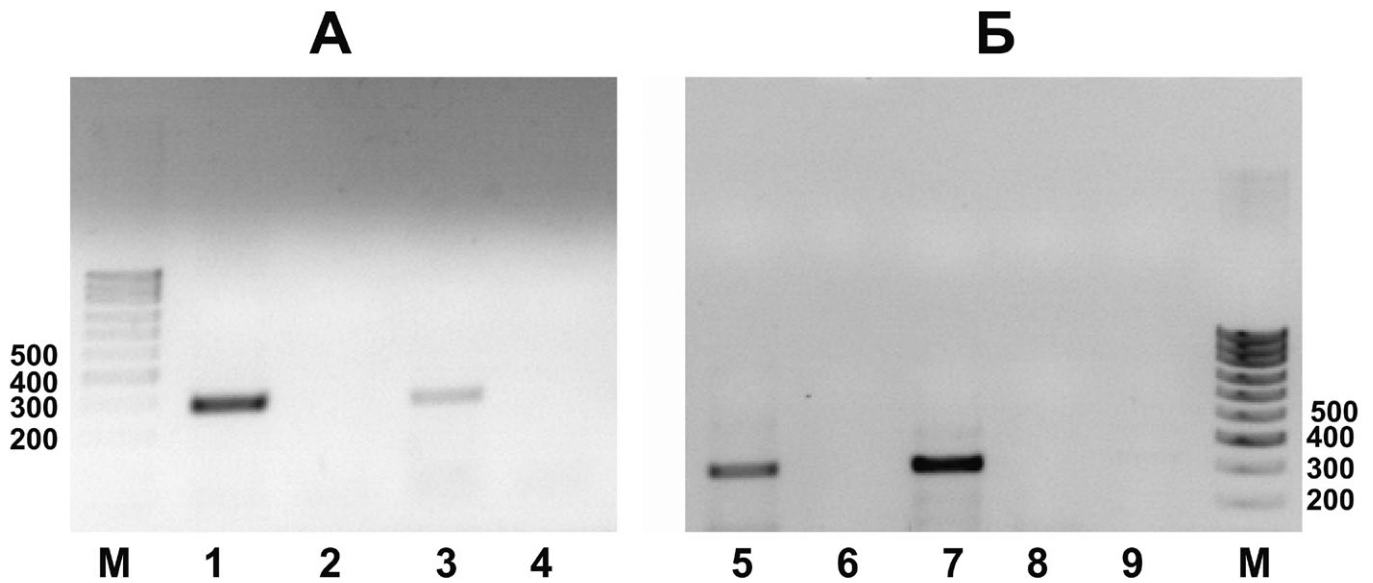


Рис. 2 Анализ экспрессии рецепторов GFR $\alpha$ 1 и RET в ЭС клетках мыши линии R1. А – экспрессия рецептора GFR $\alpha$ 1. М – маркер длин фрагментов, 1 – гиппокамп мыши (положительный контроль), 2 – гиппокамп мыши (контроль на загрязнение геномной ДНК), 3 – ЭС клетки линии R1, 4 – ЭС клетки линии R1 (контроль на загрязнение геномной ДНК). Длина продукта 285 п.н. Б – экспрессия рецептора RET. 5 – гиппокамп мыши (положительный контроль), 6 – гиппокамп мыши (контроль на загрязнение геномной ДНК), 7 – ЭС клетки линии R1, 8 – ЭС клетки линии R1 (контроль на загрязнение геномной ДНК), 9 – вода. Длина продукта 297 п.н.

культивируемые на желатиновой подложке в среде с добавлением LIF (Sigma, США). Клетки обрабатывали трипсином и готовили суспензию с концентрацией 25000 клеток/мл. На крышку чашки Петри диаметром 60 мм (Nunc, Дания) наносили по 50 капель объемом 20 мкл, содержащих по 500 клеток. Для создания влажной атмосферы в чашки наливали по 2 мл раствора Хенкса и затем помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор (5 % CO<sub>2</sub>). На третьи сутки культивирования образовавшиеся ЭТ переносили в четырехлуночные плашки (диаметр лунки 15 мм), предварительно покрытые желатином, для дальнейшей дифференцировки.

**ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ НАЛИЧИЯ БЕЛКОВОГО ПРОДУКТА ГЕНА *gdnf* ЧЕЛОВЕКА В ТРАНСФИЦИРОВАННЫХ ЛИНИЯХ ЭС КЛЕТОК.** Трехдневные ЭТ культивировали в четырехлуночном план-

шете с диаметром лунки 15 мм (Nunc, Дания) (3-4 тела на лунку), обработанном 0.01 % желатином, в 700 мкл среды для культивирования ЭС клеток, не содержащей LIF. На 7 сут культивирования дифференцированные клетки фиксировали 4 % параформальдегидом в PBS в течение 30 мин при комнатной температуре. После трехкратной отмывки PBS клетки преинкубировали в растворе PBS, содержащем 0.1 % Тритон X-100 и 5 % FBS в течение 15 мин при комнатной температуре. В качестве первичных антител использовали поликлональные куриные антитела против GDNF человека (Promega, США) в разведении 1:30 в растворе PBS-0.1 % Тритон-5 % FBS. Инкубацию проводили в течение ночи при +4 °С. После трехкратной отмывки PBS наносили вторичные биотинилированные антитела кролика против иммуноглобулинов курицы («Имтек»,

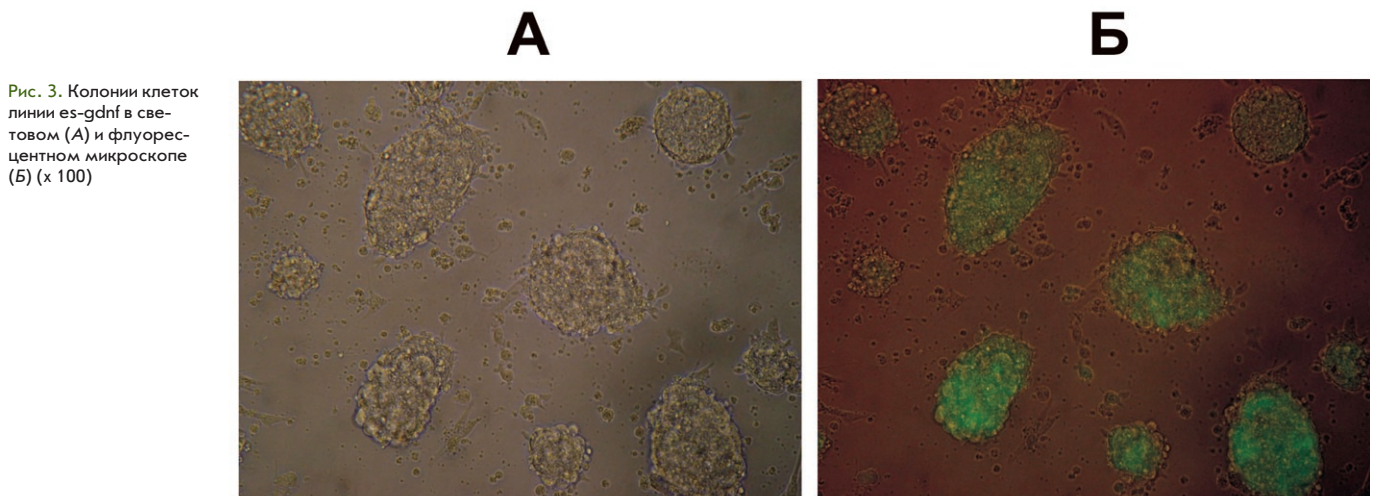


Рис. 3. Колонии клеток линии *es-gdnf* в световом (А) и флуоресцентном микроскопе (Б) (x 100)

Россия) в разведении 1:500 и инкубировали 2 ч при комнатной температуре, а затем обрабатывали конъюгатом пероксидазы со стрептавидином («Имтек», Россия) в разведении 1:400 в течение 1 ч при комнатной температуре. Проявляли реакцию с использованием 0.015 % раствора 3-амино-9-этилкарбазола (Sigma, США) в 50 мМ Трицитратном буфере, pH 7.0, содержащем 0.06 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Визуальный контроль за развитием окраски осуществляли под микроскопом Olympus СКХ41 (Olympus, Япония). Реакцию останавливали трехкратным промыванием клеток дистиллированной водой.

**СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ.** Результаты обрабатывались с помощью программы «Sigma Plot» (Jandel Scientific, США). Достоверности различий групповых средних значений оценивались с помощью дисперсионного анализа (one-way ANOVA). Результаты представлялись в виде стандартной ошибки среднего (mean ± SEM). Достоверными считались значимости различий при p < 0.05.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На начальных этапах работы в ЭС клетках мыши исходной линии R1 с помощью ОТ-ПЦР определяли наличие экспрессии рецепторов для GDNF – RET и GFRα1 на уровне мРНК. Полученные результаты представлены на (рис. 2А, Б). Из этих данных видно, что ЭС клетки экспрессируют как GFRα1, так и RET, хотя и с разной эффективностью.

В результате трансфекции соответствующими рекомбинантными плазмидами и последующей селекции ЭС клеток были получены две линии: es-gdnf (линия, несущая ген *gdnf*, слитый с геном «зеленого белка») и es-gfp (контрольная линия только с геном «зеленого белка»). Наличие вставки гена *gfp* облегчает выявление колоний клеток после проведения трансфекции, а также исследование путей и закономерностей дифференцировки ЭС клеток, особенно в опытах *in vivo*. В полученных клеточных линиях зеленое свечение наблюдалось более чем у 80 % трансфицированных клеток (рис. 3Б). С помощью Нозерн-гибридизации с использованием меченого фрагмента гена *gdnf* была показана его экспрессия в клетках линии es-gdnf (рис. 4). Кроме того, как видно из этого рисунка, в ЭС клетках происходит экспрессия и эндогенного гена *gdnf*. Для выявления син-

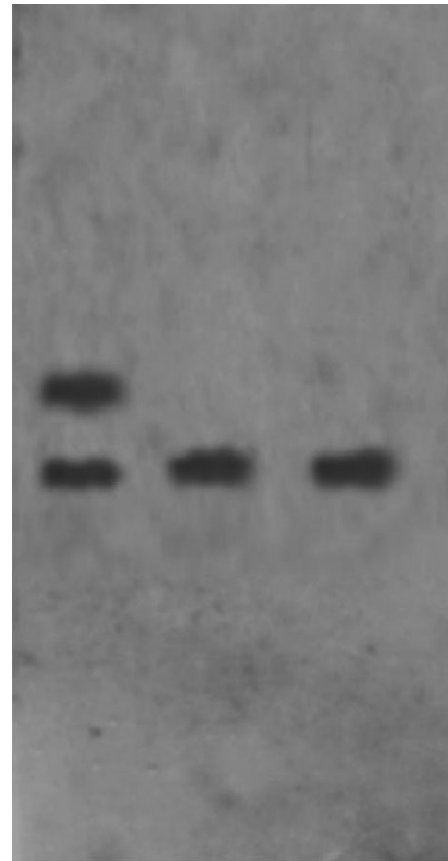


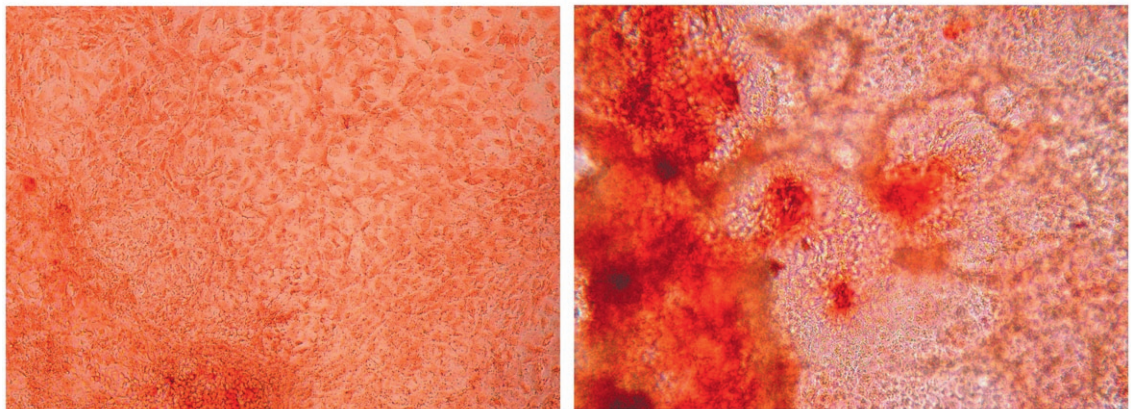
Рис. 4. Анализ экспрессии гена *gdnf* в ЭС клетках с помощью Нозерн-гибридизации. 1. РНК из ЭС клеток, трансфицированных плазмидой LP14g, несущей ген *gdnf* человека, слитый с геном *gfp*. 2. РНК из ЭС клеток, трансфицированных плазмидой pEGFP-N1, несущей ген *gfp*. 3. РНК из нетрансфицированных ЭС клеток

теза белкового продукта этого гена дифференцированные клетки линий es-gdnf и es-gfp были окрашены с помощью поликлональных антител к GDNF человека. Результаты проведенных экспериментов представлены на (рис. 5А, Б). Слабая розовая окраска (рис. 5А) обусловлена тем, что ЭС клетки, по-видимому, в небольшом количестве синтезируют собственный GDNF. Косвенное подтверждение этому,

А

Б

Рис. 5. Иммуноцитохимическое окрашивание клеток линии es-gfp (А) и es-gdnf (Б) антителами к GDNF человека (x 100)



как уже упоминалось, было получено с помощью Нозерн-гибридизации (рис. 4-2, 4-3). Ярко окрашенные кластеры клеток свидетельствуют о синтезе GDNF человека в клетках линии *es-gdnf* (рис. 5Б).

На следующем этапе было изучено влияние экспрессии гена *gdnf* человека на пролиферативную активность ЭС клеток. Сравнение пролиферативной активности опытных и контрольных клеток не выявило достоверных различий между ними (данные не приведены). Эти результаты позволяют предположить, что продукт гена *gdnf* человека не играет существенной роли в регуляции клеточного цикла этих клеток.

Был проведен анализ влияния экспрессии этого гена на начальную стадию дифференцировки трансфицированных ЭС клеток – образование ЭТ. В ходе исследования определяли время образования ЭТ и их количество. Результаты этих экспериментов (подсчет ЭТ тел проводили на 3 и 4 день после посева клеток) показали, что клетки линии *es-gdnf* образуют ЭТ практически одновременно с контрольными, однако количество ЭТ в клетках линии *es-gdnf* было на 40–45% меньше, чем в линии *es-gfp* (рис. 6). Полученные данные указывают на то, что в клетках линии *es-gdnf* происходит достоверное снижение количества ЭТ по сравнению с контролем, что свидетельствует об ингибирующем влиянии GDNF на ранние стадии дифференцировки ЭС клеток.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов была получена и частично охарактеризована линия ЭС клеток мыши, экспрессирующих ген *gdnf* человека, слитый с геном *gfp*. Повышенная экспрессия данного гена приводит к замедлению формирования ЭТ, не оказывая влияния на морфологию и пролиферативную активность трансфицированных ЭС клеток. В дальнейшем данная линия клеток может быть использована как для исследования влияния гена *gdnf* человека на последующие стадии дифференцировки ЭС клеток *in vitro*, особенно в нейро-

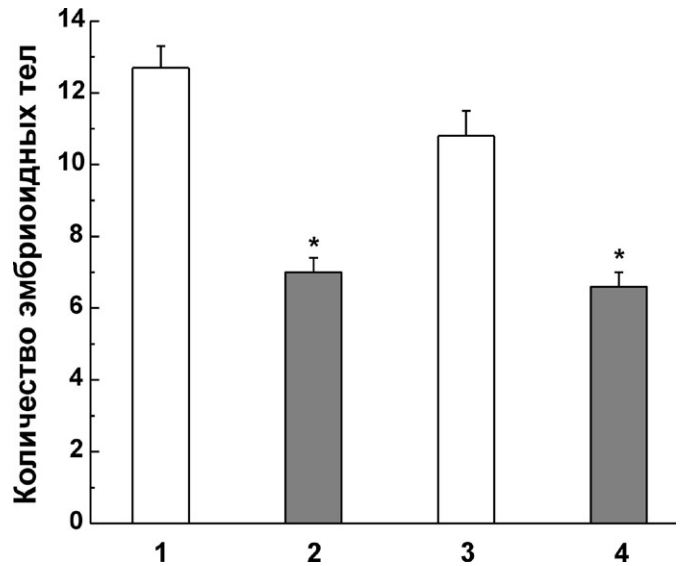


Рис. 6. Влияние экспрессии гена *hgdnf* на образование эмбрионидных тел, трансфицированными ЭС клетками *in vitro*. 1, 2 – количество образованных ЭТ на 3 день после посева клеток. 3, 4 – количество образованных ЭТ на 4 день после посева клеток. Белые столбики – контроль (*es-gfp*). Серые столбики – опыт (*es-gdnf*) \*  $p < 0.05$ ,  $n = 30$

нальном направлении, так и для экспериментов *in vivo* с целью осуществления коррекции ряда патологий мозга, связанных с нейродегенеративными заболеваниями, такими как болезнь Паркинсона. ●

Настоящая работа была выполнена при частичной поддержке гранта Министерства образования и науки РФ (ГК № 02.512.12.2013) и гранта РФФИ (09-04-01464-а).

Список литературы

1. Мануилова Е.С., Арсеньева Е.Л., Хайдарова Н.В. и др. // Онтогенез. 2003. Т. 34. № 3. С. 204–210.
2. Павлова Г.В., Модестова Е.А., Венгрова С.П. и др. // ДАН. 2001. Т. 376. № 5. С. 694–696.
3. Павлова Г.В., Ефанов А.А., Башкиров В.Н. и др. // Цитология. 2002. Т. 44. № 11. С. 1104–1108.
4. Bain G., Kitchens D., Yao M., Huettner J.E., Gottlieb D.I. // Dev Biol. 1995. V. 168. № 2. P. 342–357.
5. Buytaert-Hoefen K.A., Alvarez E., Freed C.R. // Stem cells. 2004. V. 22. № 5. P. 669–674.
6. Fraichard A., Chassande O., Bilbaut G. et al. // J. Cell Sci. 1995. V. 108. № 10. P. 3181–3186.
7. Guan K., Rohwedel J., Wobus A.M. // Cytotechnology. 1999. V. 30. № 4. P. 211–226.
8. Kawai K., Iwashita T., Murakami H. et al. // Cancer Res. 2000. 15. V. 60. № 18. P. 5254–5260.
9. Kawasaki H., Mizuseki K., Nishikawa S. et al. // Neuron. 2000. V. 28. № 1. P. 31–40.
10. Kim J.H., Auerbach J.M., Rodrigues-Gomez J.A. et al. // Nature. 2002. V. 418. № 6893. P. 50–56.
11. Klug M.G., Soonpaa M.H., Koh G.Y., Field L.J. // J. Clin. Invest. 1996. V. 98. № 1. P. 216–224.
12. Lin L.F., Doherty D.H., Lile J.D. et al. // Science. 1993. V. 260. № 5111. P. 1130–1132.
13. Manuilova E.S., Arsenyeva E.L., Khaidarova N.V. et al. // IJBS. 2008. V. 4. № 1. P. 29–37.
14. Sariola H., Saarma M. // J. Cell Sci. 2003. V. 116. № 19. P. 3855–3862.
15. Soria B., Roche E., Berná G. et al. // Diabetes. 2000. V. 49. № 2. P. 157–162.
16. Wiles M.V., Keller G. // Development. 1991. V. 11. № 2. P. 259–267.
17. Yue F., Cui L., Johkura K. // Stem cells. 2006. V. 24. № 7. P. 1625–1706.
18. Zeng X., Cai J., Chen J. et al. // Stem cells. 2004. V. 22. № 6. P. 925–940.

УДК 577.113.088.52..543.51..616

# Прямое МАЛДИ масс-спектрометрическое профилирование бактериальных белков для индикации и характеристики патогенов

Е. Н. Ильина

Научно-исследовательский институт Физико-химической медицины Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию  
e-mail: ilinaEN@gmail.com

**РЕФЕРАТ** Настоящая работа посвящена изучению возможностей и ограничений прямого МАЛДИ (матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация) масс-спектрометрического профилирования бактериальных белков для исследования микробных популяций. Оптимизирован лабораторный протокол анализа, включающий грубый лизис бактерий в растворе 50 % ацетонитрила, 2,5 % трифторуксусной кислоты и применение  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричной кислоты в качестве МАЛДИ матрицы. В исследование включены два вида бактерий, традиционно относящихся к микроорганизмам с высокой пластичностью геномов. В совокупности проанализированы масс-спектры от 278 штаммов *Neisseria gonorrhoeae* и 22 штаммов *Helicobacter pylori*. Типичные МАЛДИ масс-спектры *N. gonorrhoeae* содержали около 70 пиков, 20 из которых были хорошо воспроизводимы. Хотя для 3 пиков обнаружены отличия в спектрах некоторых штаммов, в целом популяция *N. gonorrhoeae* отличалась низкой гетерогенностью. Этот факт свидетельствует в пользу перспективности использования прямого МАЛДИ масс-спектрометрического профилирования для видовой идентификации гонококка. В случае со штаммами *H. pylori* выявлена существенная вариабельность среди накопленных масс-спектров. Только 5 пиков присутствовали в более 70 % образцов и сохраняли неизменными значения масс для всех спектров. Хотя эти данные ставят под вопрос возможность адекватной видовой идентификации для *H. pylori* с помощью этого подхода, предложено его применение для штаммового типирования. Продемонстрировано наличие ассоциации между распределением МАЛДИ профилей и регионом изоляции штамма.

**Ключевые слова:** МАЛДИ масс-спектрометрия, профилирование бактерий, *Neisseria gonorrhoeae*, *Helicobacter pylori*.

## ВВЕДЕНИЕ

Современная микробиология, ее прикладные направления требуют развития новых быстрых и точных методов для идентификации клинически значимых патогенов и описания их характерологических признаков – вирулентность, чувствительность к антибиотикам, штаммовая принадлежность. Одним из активно развивающихся направлений в этой области является применение прямой МАЛДИ масс-спектрометрии для осуществления анализа бактериальных клеток. Относительная толерантность МАЛДИ к загрязнению солями и другими примесями позволяет проводить прямой масс-спектрометрический анализ содержимого микробной клетки (прямое профилиро-

вание), т.е. без фракционирования и очистки отдельных компонентов.

В общем случае метод предполагает анализ сложных смесей клеточных компонентов (белков, пептидов, липидов, нуклеиновых кислот). Однако рецептура применяемых матриц и параметры снятия масс-спектров позволяют регистрировать преимущественно белковые молекулы, что наиболее ценно: белки хорошо представлены в клетке в количественном соотношении и, вместе с тем, характеризуются определенной изменчивостью.

Возможность регистрации масс-спектров, уникальных и воспроизводимых для семейств, родов, видов и подвигов микроорганизмов, формирует основу для применения

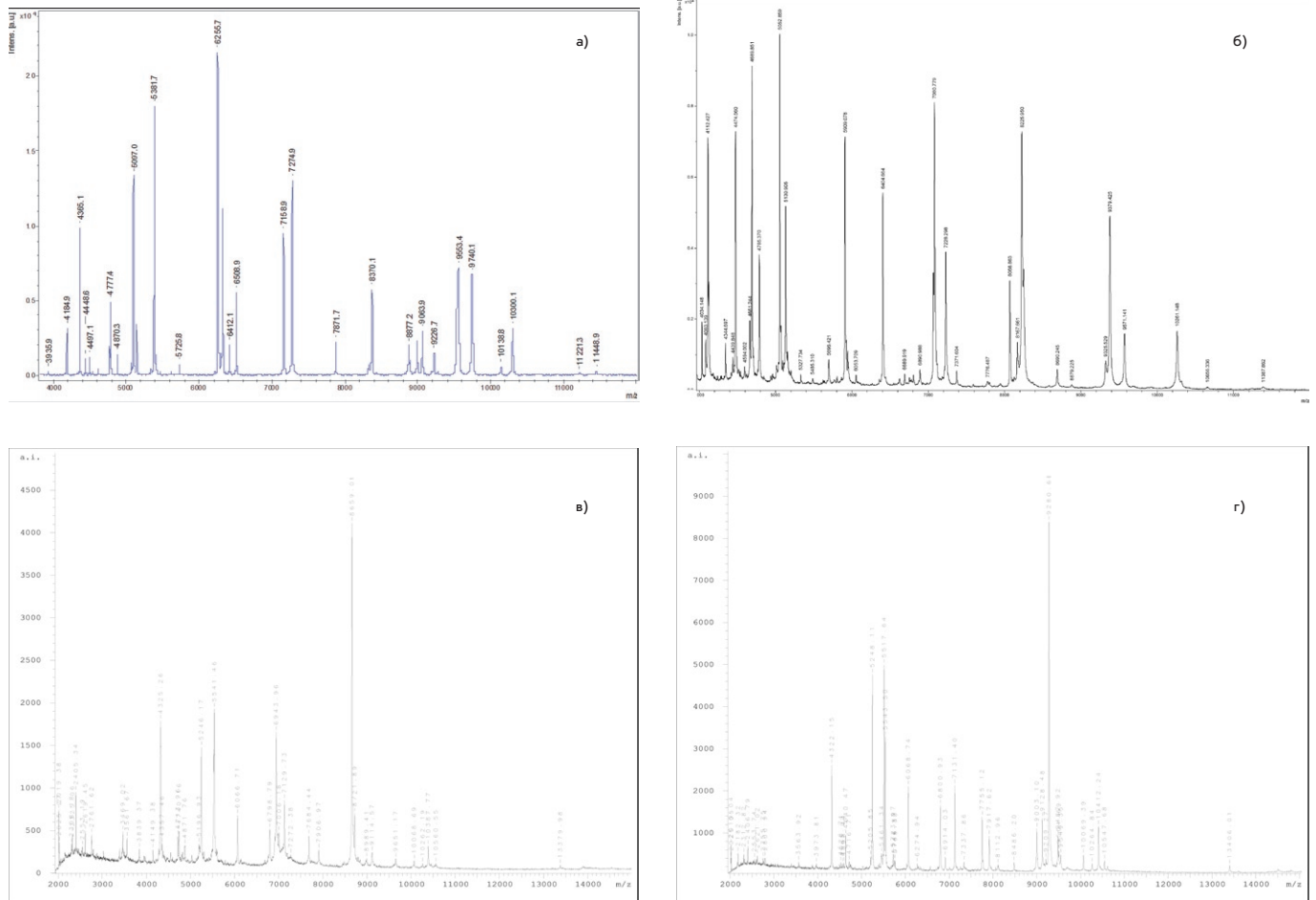


Рис. 1. МАЛДИ масс-спектры экстрактов клеток штаммов *E. coli* DH-5α (а), *N. gonorrhoeae* ATCC 49226 (б), *H. pylori* J99 (в) и *H. pylori* 26695, снятые при использовании α-СНСА матрицы

масс-спектрометрии для идентификации и типирования бактерий, что впервые было показано в 1975 г. [1]. Несмотря на то, что спектр «целой клетки» (без какого-либо разделения клеточных компонентов) отражает только небольшую часть клеточной протеомы, он достаточно хорошо характеризует таксономические особенности, что продемонстрировано для ряда бактерий [2, 3, 4, 5, 6]. Стоит отметить, что такой подход не предполагает идентификацию отдельных микробных белков, а позволяет использовать уникальный масс-профиль для характеристики микроорганизма по принципу «отпечатков пальцев» [7]. Особенности и, вместе с тем, преимуществами такого подхода перед традиционными методами являются: 1) достаточно высокая чувствительность ( $10^5$ - $10^6$  клеток, или 0.5 мкг культуры клеток), 2) простая пробоподготовка, 3) высокая скорость измерения, 4) возможность автоматизации и роботизации всех стадий исследования.

В настоящем исследовании возможности и ограничения прямого МАЛДИ масс-спектрометрического профилирования бактерий продемонстрированы для микробных популяций – *Helicobacter pylori* и *Neisseria gonorrhoeae*, которые традиционно относят к микроорганизмам с высокой

пластичностью геномов. При этом ставились задачи оценить вариабельность МАЛДИ масс-профилей, снятых по единому протоколу, внутри каждой бактериальной популяции.

### МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

**БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ШТАММЫ.** В работе использованы лабораторные штаммы *Escherichia coli* DH5α, *Neisseria gonorrhoeae* ATCC 49226, *Helicobacter pylori* J99, *Helicobacter pylori* 26695; 278 клинических штаммов *N. gonorrhoeae*, выделенных в различных регионах РФ (Москва, Санкт-Петербург, Самара, Екатеринбург, Мурманск, Иркутск); 22 клинических штамма *H. pylori*, выделенных в Монголии, Туве, Якутии и Московском регионе.

Для масс-спектрометрического анализа использовали свежие культуры, находящиеся в стационарной фазе роста, полученные по стандартным для каждого микроорганизма методикам культивирования.

### ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ ДЛЯ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА.

Лизис бактериальных клеток осуществляли путем ресуспендирования культуры бактерий (одиночная колония)

в 50 мкл 50 % ацетонитрила (АЦН, Sigma-Aldrich, Германия), 2,5 % трифторуксусной кислоты (ТФУ, Sigma-Aldrich, Германия). Полученный в результате последующего центрифугирования (1 мин при 14000 об/мин) супернатант использовали для МАЛДИ масс-спектрометрического анализа. В качестве матрицы применяли  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричную кислоту ( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid,  $\alpha$ -CHCA, Bruker Daltonics, Германия) в виде насыщенного раствора в смеси 50 % АЦН, 2,5 % ТФУ. Все использованные реактивы, включая воду, были аналитической чистоты или специальные для масс-спектрометрии.

**МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ.** Масс-спектрометрический анализ осуществляли с помощью времяпролетного МАЛДИ масс-спектрометра Microflex™ (Bruker Daltonics, Германия), оснащенного азотным лазером 337 нм. Все измерения проводили в линейном режиме, детектируя положительные ионы. Для накопления масс-спектров мощность лазерного излучения устанавливали на уровне минимального порогового значения, достаточного для десорбции-ионизации образца. Параметры масс-спектрометра оптимизировали для диапазона  $m/z$  от 2000 до 20000. Внешнюю калибровку проводили с использованием точных значений масс известных белков *E. coli*. Образец наносили на три ячейки планшета, для каждой из которых записывали спектр, полученный в результате суммирования 10 серий спектров по 50 импульсов лазера для каждой. Для записи, обработки и анализа масс-спектров использовали программное обеспечение фирмы Bruker Daltonics (Германия): flexControl 2.4 (Build 38) и flexAnalysis 2.4 (Build 11). Точность измерения масс составляла  $\pm 2$  Да.

**ИНТЕРПРЕТАЦИЯ МАСС-СПЕКТРОВ.** При интерпретации масс-спектров исходили из предположения, что большая часть регистрируемых пиков соответствует белковым молекулам, а определяемые массы – массам целых (не фрагментированных) белков. Идентификацию белков проводили путем поиска совпадения значений экспериментальных масс с массами белков, аннотированных в соответствующих базах данных (SwissProt/TrEMBL) с использованием ресурсов ExPASy-сервера (<http://ca.expasy.org/srs5/>). При вводе параметра «молекулярный вес» использовали экспериментальное значение массы, измеряемое с точностью  $\pm 2$  Да. В случае неудачи проводили повторный поиск со значением массы, соответствующим утрате N-концевого метионина, учитывая возможность посттрансляционной модификации белков.

**СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА ДАННЫХ.** Для формирования промежуточных таблиц, осуществления элементарных расчетов, описательной статистики, построения диаграмм использовали программные ресурсы пакета Microsoft Office Excel 2003. Кластерный анализ производили с помощью программного пакета Statistica 6.0.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Протокол прямого МАЛДИ масс-спектрометрического профилирования бактерий оптимизирован с использованием лабораторного штамма *E. coli* DH5 $\alpha$ , что обусловлено имеющейся массивной информацией о белковых и нуклеотид-

ных последовательностях этого микроорганизма. За основу метода взят кислотный лизис бактериальных клеток, при котором наиболее полно экстрагируются основные рибосомальные белки, составляющие 20 % от общего пула белков *E. coli* [8].

В ходе проведенных экспериментов для получения клеточного лизата протестированы смеси растворителей с различными концентрациями и соотношениями АЦН и ТФУ, а также проанализированы три наиболее распространенные матрицы, используемые для ионизации образца в МАЛДИ масс-спектрометрии. Критериями оценки в данном случае являлись воспроизводимость МАЛДИ масс-профилей внутри одного штамма, разрешение пиков масс-спектра, соотношение сигнала к шуму, число пиков (представленность масс-спектра), их интенсивность и диапазон значений масса/заряд ( $m/z$ ), регистрируемых в ходе анализа. На основании экспериментальных данных для дальнейших этапов исследования выбран оптимальный раствор для лизиса бактериальных клеток (50 % АЦН, 2,5 % ТФУ), позволяющий получить наиболее качественные масс-спектры при использовании любого матричного вещества, включенного в исследование.

Подобранные условия прямого МАЛДИ масс-спектрометрического профилирования позволили полу-

Табл. 1. Перечень максимально воспроизводимых пиков масс-спектра лабораторного штамма *N. gonorrhoeae* ATCC 49226. Жирным шрифтом выделены пики, предположительно соответствующие рибосомальным белкам

№	M (m/z)	M <sup>1</sup> (Да)	Тип иона <sup>2</sup>	Описание
1	4474	4473	M+H <sup>+</sup>	RL36
2	4511			
3	4689	9377 <sup>3</sup>	M+2H <sup>+</sup>	RS20
4	4784	9570	M+2H <sup>+</sup>	RL27
5	5010			
6	5052	5051	M+H <sup>+</sup>	RL34
7	5130	10259 <sup>3</sup>	M+2H <sup>+</sup>	RS19
8	5484			
9	5908	5907	M+H <sup>+</sup>	RL33
10	5946			
11	6053			
12	6404	6402 <sup>3</sup>	M+H <sup>+</sup>	RL32
13	7080	7078	M+H <sup>+</sup>	RL29
14	7227	7226 <sup>3</sup>	M+H <sup>+</sup>	RL35
15	8068			
16	8167	8165	M+H <sup>+</sup>	RL31
17	8225	8224 <sup>3</sup>	M+H <sup>+</sup>	RS21
18	9379	9377 <sup>3</sup>	M+H <sup>+</sup>	RS20
19	9570	9568 <sup>3</sup>	M+H <sup>+</sup>	RL27
20	10260	10259 <sup>3</sup>	M+H <sup>+</sup>	RS19

<sup>1</sup> – масса белка, аннотированная в базах данных SwissProt/TrEMBL.  
<sup>2</sup> – тип ионов указан только для пиков, которым поставлены в соответствие белки.  
<sup>3</sup> – указана масса белка с потерей N-концевого метионина.

чить спектр *E. coli*, качественный состав которого аналогичен спектру, полученному ранее для штамма *E. coli* K-12 [9], за исключением нескольких пиков. Это несоответствие вполне закономерно, учитывая тот факт, что нами проанализирован другой штамм *E. coli* – DH5α.

Типичные МАЛДИ масс-спектры, полученные для лабораторных штаммов *E. coli* DH5α, *N. gonorrhoeae* ATCC 49226, *H. pylori* J99, *H. pylori* 26695 по разработанному протоколу, представлены на *рис. 1*. Хотя снятие масс-спектров осуществляли в диапазоне 2000–20000 *m/z*, визуально наиболее информативным является участок от 2000 до 12000 *m/z*. Более того, тщательный анализ масс спектров показал, что большинство пиков с *m/z* 2000–4000 соответствуют двухзарядным ионам молекул, однозарядные ионы которых регистрируются в тех же спектрах. Поэтому в дальнейшем анализе основное внимание уделялось области МАЛДИ масс-спектра в диапазоне 4000–12000 *m/z*. В целом, пик-лист, полученный для лабораторного штамма *E. coli* DH5α в текущем исследовании, соответствует таковому, представленному ранее для штамма *E. coli* K-12 [9].

Для лабораторного штамма *N. gonorrhoeae* ATCC 49226 при каждом измерении регистрируется около 70 пиков, из которых 20 являются хорошо воспроизводимыми. Проведенная процедура идентификации продемонстрировала соответствие 14 из этих пиков рибосомальным белкам гонококка (*табл. 1*). Аналогичные данные получены для лабораторных штаммов *H. pylori* J99 и *H. pylori* 26695 – выявлены порядка 20 воспроизводимых белков, из которых 14 соответствовали рибосомальным.

В результате сравнения спектров, полученных для двух штаммов *H. pylori* J99 и 26695, обнаружены отличия (смещение, наличие/отсутствие пиков) (*рис. 1, табл. 2*). Отличия в пиках, отнесенных к рибосомальным белкам, удалось интерпретировать, основываясь на аннотации геномов этих двух штаммов, в частности, на информацию об аминокислотной последовательности соответствующих белков (RL32, RL29, RL24, RS16), другие изменения пиков спектра объяснить на данном уровне не представлялось возможным.

Отработанная методика получения воспроизводимых МАЛДИ масс-профилей бактериальных штаммов позволила проанализировать географически неоднородные группы клинических штаммов гонококка и *H. pylori*.

Проведено МАЛДИ масс-спектрометрическое профилирование 278 клинических штаммов *N. gonorrhoeae*, выделенных в различных регионах России. По данным сравнительного анализа полученных масс-спектров (пик-листов) выявлены три пика со значениями *m/z*, равными 4473, 5051 и 8165, соответствующие рибосомальным белкам RL36, RL34 и RL31, согласно масс-спектру *N. gonorrhoeae* ATCC 49226, которые меняются у ряда штаммов на 4487, 5081 и 8146 соответственно. Среди исследованной группы штаммов обнаружены четыре варианта сочетаний меняющихся значений *m/z* этих белков. Учитывая неизменность остальных значений *m/z* в спектре, выделено четыре типа МАЛДИ масс-профилей (протеотипов) гонококка. Исследованные штаммы гонококка (*n* = 278) распределились следующим образом: подавляющее большинство – 236 (84.9 %) относились к типу 1 (*m/z* 4473/5051/8165), соответствующему контрольному штамму *N. gonorrhoeae*

Рис. 2. Распределение штаммов *H. pylori*, выделенных от пациентов Мордовы (m), Тувы (t), Якутии (y) и Московского региона (mo) по результатам кластерного анализа МАЛДИ масс-профилей

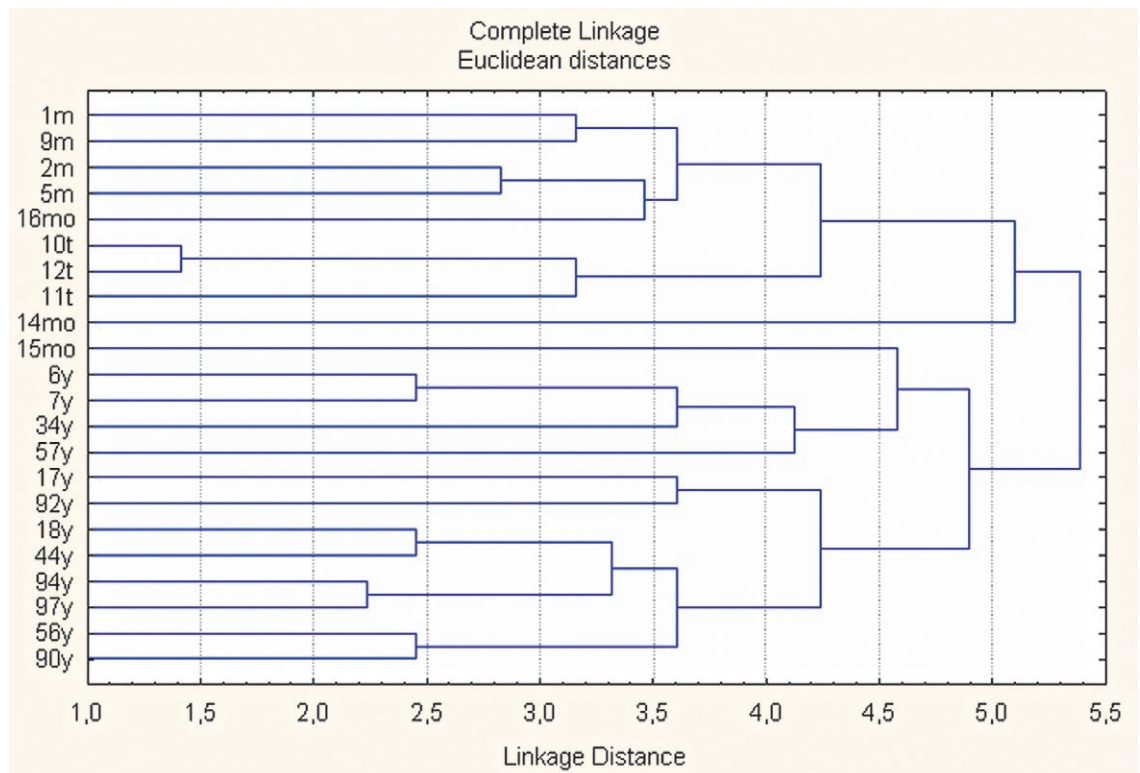




Табл. 2. Перечень максимально воспроизводимых пиков масс-спектров лабораторных штаммов *H. pylori* J99 и *H. pylori* ATCC 26695. Жирным шрифтом выделены пики, предположительно соответствующие рибосомальным белкам

H. pylori J99		H. pylori ATCC 26695		M <sup>1</sup> (Да)	Тип иона <sup>2</sup>	Описание
№	M (m/z)	№	M (m/z)			
1	4322	1	4322	4320	M+H <sup>+</sup>	RL36
2	5247	2	5247	5246	M+H <sup>+</sup>	RL34
3	5517			5515	M+H <sup>+</sup>	RL32
		3	5530	5529	M+H <sup>+</sup>	RL32
4	5541	4	5541			
5	6068	5	6068	6066	M+H <sup>+</sup>	RL33
6	6799	6	6799	6798 <sup>3</sup>	M+H <sup>+</sup>	RL28
7	6912	7	6912			
8	6947	8	6947	6946	M+H <sup>+</sup>	Hpn <sup>4</sup>
9	7130	9	7130	7129 <sup>3</sup>	M+H <sup>+</sup>	RL35
10	7654	10	7654	7652	M+H <sup>+</sup>	RL31
		11	7684	7683	M+H <sup>+</sup>	RL29
11	7753			7752	M+H <sup>+</sup>	RL29
		12	7906	7905	M+H <sup>+</sup>	RL24
12	7917			7915	M+H <sup>+</sup>	RL24
13	8484	13	8484	8482	M+H <sup>+</sup>	RS21
		14	8657			
14	8972			8971	M+H <sup>+</sup>	RS16
		15	8986	8985	M+H <sup>+</sup>	RS16
		16	9114			
15	9129					
16	10067	17	10067	10065	M+H <sup>+</sup>	RS20
17	10260	18	10260			
		19	10384			
18	10414					
19	10450	20	10450	10448	M+H <sup>+</sup>	RS18
		21	10544	10543	M+H <sup>+</sup>	RS19
20	10557					

<sup>1</sup> – масса белка, аннотированная в базах данных SwissProt/TrEMBL.

<sup>2</sup> – тип ионов указан только для пиков, которым поставлены в соответствие белки.

<sup>3</sup> – указана масса белка с потерей N-концевого метионина.

<sup>4</sup> – гистидин-богатый металл-связывающий полипептид Hpn (histidine-rich, metal binding polypeptide), про который известно, что он связывает Ni<sup>2+</sup> и Zn<sup>2+</sup>, однако его функция в жизнедеятельности бактериальной клетки остается неясной [14].

ATCC 49226, 26 штаммов (9.4 %) были отнесены к типу 2 (m/z 4487/5051/8165), 15 штаммов (5.4 %) к типу 3 (m/z 4487/5051/8147) и 1 штамм из Иркутска (0.4 %) – к типу 4. Индекс разнообразия Симпсона [10] для типирования прямым масс-спектрометрическим профилированием коллекции штаммов гонококка составил 0.27.

Проведено типирование 22 клинических изолятов *H. pylori*, выделенных в разных регионах России (Якутия, Тува, Мордовия, Московская область). Сравнительный

анализ полученных масс-спектров между собой выявил большое количество вариаций и отличий. Основываясь на предположении о том, что регистрируемые смещения пиков – изменения значений m/z, группирующиеся вокруг некоего среднего значения, отражают изменения массы и, вероятно, структуры, одного и того же белка, можно заключить, что только 2 из 20 белков спектра сохраняют постоянную массу в исследованной группе. Тем не менее, кластерный анализ полученных пик-листов позволил сгруппировать анализируемые изоляты в три большие группы, коррелирующие с географической принадлежностью штаммов (рис. 2). Учитывая малый объем выборки (менее 30), индекс разнообразия Симпсона не вычислялся.

Осуществленное прямое МАЛДИ масс-спектрометрическое профилирование лабораторного (n = 1) и клинических (n = 278) штаммов *N. gonorrhoeae*, несмотря на богатые масс-спектры – до 70 пиков, выявило однородность получаемых профилей в исследуемой группе. Отдельно следует отметить, что в целом МАЛДИ масс-спектры, снятые для гонококка по разработанному протоколу, существенно богаче аннотированных ранее [11]. Наблюдаемые незначительные отличия качественного состава масс-спектров в группе клинических штаммов гонококка согласуются с нашим представлением о высокой консервативности рибосомальных белков.

Низкая гетерогенность качественного состава масс-спектров делает бессмысленным обсуждение возможности применения этого подхода для типирования гонококка. Однако обратная сторона этого результата – стабильность качественного состава масс-спектра – открывает перспективы для видовой идентификации возбудителя с использованием данного подхода. Сформированный маркерный масс-профиль из 20 устойчиво воспроизводимых пиков может быть использован для идентификации отдельного вида путем сравнения его с экспериментальным масс-спектром, принадлежащим неизвестному микроорганизму.

Осуществленное прямое МАЛДИ масс-спектрометрическое профилирование лабораторных (n = 2) и клинических (n = 22) штаммов *H. pylori*, наоборот, продемонстрировало существенную гетерогенность полученных масс-профилей. При этом варьировал как качественный, так и количественный состав спектров. Если для лабораторных штаммов были получены относительно богатые масс-спектры (до 30 пиков), то для ряда клинических штаммов спектры были крайне бедные – 7-13 пиков. Подобные результаты представлены и в более ранних исследованиях [12, 13], что свидетельствует о закономерности этого явления. В масс-профилях исследованных штаммов только 5 пиков сохранялись неизменными, из которых 4 предположительно соответствуют рибосомальным белкам и один – гистидин-богатому металл-связывающему полипептиду Hpn (histidine-rich, metal binding polypeptide), про который известно, что он связывает Ni<sup>2+</sup> и Zn<sup>2+</sup>, однако его функция в жизнедеятельности бактериальной клетки остается неясной [14].

Следует отметить, что наблюдаемая нами значительная изменчивость внутри вида в целом согласуется с известной отличительной особенностью хеликобактера – выраженной

макро- и микрогетерогенностью генома [15, 16, 17]. Фиксация внутривидовой гетерогенности данным методом дает основания полагать, что этот подход может быть использован для внутривидовой классификации и типирования микроорганизмов, что и было продемонстрировано с привлечением средств кластерного анализа.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Обобщение опыта применения прямого МАЛДИ масс-спектрометрического профилирования бактерий позволяет сделать вывод о возможной видовой идентификации возбудителя с использованием этого подхода, что продемонстрировано на примере анализа обширной группы клинических штаммов *N. gonorrhoeae*. Напротив, внутривидовая классификация и типирование микробов данным методом,

вероятно, мало информативны для видов с низкой внутривидовой изменчивостью.

С другой стороны, возможность идентификации бактерий, характеризующихся высокой внутривидовой изменчивостью, таких как *H. pylori*, остается неопределенной и требует дальнейшего изучения. В этом случае полученные данные демонстрируют перспективу использования прямого МАЛДИ масс-спектрометрического профилирования для штаммовой дифференцировки и типирования бактерий. ●

*Источник грантового финансирования данной работы:  
грант № 270505 (# 30686) от компании  
Брукер Дальтоник (Германия).*

### Список литературы

- Byrne V, Iwata S (2002) Membrane protein complexes. *Curr Opin in Struct Biol* 12: 239-243.
- Grishammer R, Tate CG (1995) Overexpression of integral membrane proteins for structural studies. *Q Rev. Biophys* 28: 314-422.
- Jana S, Deb JK (2005) Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 67:289-298.
- Drew D, Fröderberg L, Baars L, de Gier JW (2003) Assembly and overexpression of membrane proteins in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 1610: 3-10.
- Legros, C, Pollmann, V, Knaus, H-G, Farrell, AM, Darbon, H, Bougis, PE, Martin-Eauclaire, MF, Pongs, O (2000) Generating a high-affinity scorpion toxin receptor in KcsA-Kv1.3 chimeric potassium channels. *J Biol Chem* 275: 16918-16924.
- Legros C, Schulze C, Garcia ML, Bougis PE, Martin-Eauclaire MF, Pongs O (2002) Engineering-specific pharmacological binding sites for peptidyl inhibitors of potassium channels into KcsA. *Biochemistry* 41: 15369-15375.
- Shieh CC, Coghlan M, Sullivan JP, Gopalakrishnan M (2000) Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol Rev* 52:557-594.
- Beeton C, Wulff H, Barbara J, Clot-Faybesse O, Pennington M, Bernard D, Cahalan MD, Chandy KG, Béraud E (2001) Selective blockade of T lymphocyte K(+) channels ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis, a model for multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:13942-13947.
- Kaczorowski GJ, Garcia ML (1999) Pharmacology of voltage-gated and calcium-activated potassium channels. *Curr Opin Chem Biol* 3: 448-458.
- MacKinnon R (2003) Potassium channels. *FEBS Lett* 555: 62-65.
- Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science* 280: 69-77.
- MacKinnon R, Cohen SL, Kuo A, Lee A, Chait BT (1998) Structural conservation in prokaryotic and eukaryotic potassium channels. *Science* 280:106-109.
- Sambrook, J, Fritsch, EF and Mniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Laemmli, UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Irizarry SN, Kutluay E, Drews G, Hart SJ, Heginbotham L (2002) Opening the KcsA K<sup>+</sup> channel: tryptophan scanning and complementation analysis lead to mutants with altered gating. *Biochemistry* 41: 13653-13662.
- Cortes DM, Perozo E (1997) Structural dynamics of the *Streptomyces lividans* K<sup>+</sup> channel (SKC1): oligomeric stoichiometry and stability. *Biochemistry* 36: 10343-10352.
- Singh SM, Panda AK (2005) Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J Biosci Bioeng* 99: 303-310.
- van Heerikhuizen H, Kwak E, van Bruggen EF, Witholt B (1975) Characterization of a low density cytoplasmic membrane subfraction isolated from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 413: 177-191.
- Schrempf H, Schmidt O, Kümmerlen R, Hinnah S, Müller D, Betzler M, Steinkamp T, Wagner R (1995) A prokaryotic potassium ion channel with two predicted transmembrane segments from *Streptomyces lividans*. *EMBO J* 14: 5170-5178
- Carlone GM, Thomas ML, Rumschlag HS, Sottnek FO (1986) Rapid microprocedure for isolating detergent-insoluble outer membrane proteins from *Haemophilus* species. *J Clin Microbiol* 24: 330-332.
- Gauthier A, Puente JL, Finlay BB (2003) Secretin of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system requires components of the type III apparatus for assembly and localization. *Infect Immun* 71:3310-3319.
- Fiermonte G, Walker JE, Palmieri F (1993) Abundant bacterial expression and reconstitution of an intrinsic membrane-transport protein from bovine mitochondria. *Biochem J* 294: 293-299
- Kerman A, Ananthanarayanan VS (2005) Expression and spectroscopic characterization of a large fragment of the mu-opioid receptor. *Biochim Biophys Acta* 1747:133-40
- Shimada Y, Wang ZY, Mochizuki Y, Kobayashi M, Nozawa T (2004) Functional expression and characterization of a bacterial light-harvesting membrane protein in *Escherichia coli* and cell-free synthesis systems. *Biosci Biotechnol Biochem* 68:1942-1948.
- van Dalen A, Schrempf H, Killian JA, de Kruijff B (2000) Efficient membrane assembly of the KcsA potassium channel in *Escherichia coli* requires the protonmotive force. *EMBO Rep* 1:340-346.
- Nekrasova OV, Ignatova AA, Nazarova AI, Feofanov AV, Korolkova YV, Boldyryeva EF, Tagvei AI, Grishin EV, Arseniev AS, Kirpichnikov MP (2008) Recombinant Kv Channels at the Membrane of *Escherichia coli* Bind Specifically Agitoxin2. *J Neuroimmune Pharmacol* DOI 10.1007/s11481-008-9116-4.
- Garcia ML, Garcia-Calvo M, Hidalgo P, Lee A, MacKinnon R (1994) Purification and characterization of three inhibitors of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels from *Leiurus quinquestriatus* var. *hebraeus* venom. *Biochemistry* 33: 6834-6839.
- Valiyaveetil FI, MacKinnon R, Muir TW (2002) Semisynthesis and folding of the potassium channel KcsA. *J Am Chem Soc* 124:9113-9120.

УДК 577.181

# Гены антимикробных пептидов для терапии внутриклеточных инфекций

**В. Н. Лазарев**

Научно-исследовательский институт физико-химической медицины  
Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию  
e-mail: lazar0@mail.ru

**Р**езистентность к антибиотикам имеет огромное социально-экономическое значение и рассматривается как угроза национальной безопасности любой страны и мирового сообщества в целом. Среди бактериальных возбудителей различных инфекций резистентность к отдельным антибиотикам может достигать 98 %. Инфекции, вызванные резистентными штаммами, отличаются длительным течением, чаще требуют госпитализации и увеличивают продолжительность пребывания в стационаре, ухудшают прогноз для пациентов [1]. При неэффективности выбранных препаратов приходится использовать средства второго или третьего ряда, которые зачастую более дороги, менее безопасны и не всегда доступны. Все это увеличивает прямые и не прямые экономические затраты, а также повышает риск распространения резистентных штаммов. Особенно это характерно для возбудителей внутриклеточных инфекций – микоплазм и хламидий. Терапия микоплазмозов и хламидиозов с использованием антибиотиков широкого спектра действия является мало эффективной вследствие быстрого возникновения резистентности к этим препаратам и, как результат, – развития персистенции возбудителя в организме.

В связи с этим поднимается вопрос о создании альтернативных терапевтических средств, резистентность к которым будет развиваться ограниченно или полностью отсутствовать. Такими средствами могут явиться антимикробные пептиды (АМП) – уникальная и чрезвычайно разнообразная группа соединений, являющаяся основным компонентом врожденного иммунитета всех организмов [2]. Несомненными преимуществами антимикробных

пептидов перед антибиотиками являются более широкий спектр антибактериального действия, функциональная активность при микромолярных концентрациях, отсутствие возможности формирования резистентности возбудителей к антимикробным пептидам, возможность синтеза аналогов природных пептидов с измененными биологическими свойствами. Невозможность формирования устойчивости к АМП объясняется уникальным механизмом их действия, заключающимся в формировании каналов и последующей фрагментацией мембраны бактериальной клетки. Однако к настоящему времени во всех исследованиях, посвященных изучению АМП, применяют экзогенные, т.е. искусственно синтезированные пептиды, в то время как механизм действия АМП, которые синтезируются непосредственно в инфицированной клетке, остается пока неясным. В качестве модельного пептида мы выбрали мелитин, амфипатический  $\alpha$ -спиральный пептид – основной компонент пчелиного яда [3].

В нашей работе мы впервые показали ингибирование экспериментальной инфекции *Mycoplasma hominis* и *Chlamydia trachomatis* у мышей и *Mycoplasma gallisepticum* у цыплят бройлеров.

В настоящей работе мы использовали плазмидный вектор pBI/mel2/rtTA, содержащий ген мелитина под контролем тетрациклин-зависимого промотора CMV и ген транскрипционного белка rtTA под контролем конститутивного раннего промотора CMV [4].

При использовании такой плазмидной конструкции возможно точное регулирование уровня экспрессии генов антимикробных пептидов в организме с помощью различ-

Табл. 1. Влияние введения рекомбинантного плазмидного вектора pBI/mel2/rtTA на динамику выделения *S. trachomatis* из влагалища инфицированных мышей

Сроки наблюдения	Титр <i>S. trachomatis</i> во влагалищных смывах инфицированных мышей (количество включений <i>S. trachomatis</i> /мл)						
	2 дня	6 дней	9 дней	13 дней	16 дней	20 дней	27 дней
Группа 1	12950	8490	4250	5220	2510	1070	1570
Группа 2	12600	9750	3930	4850	2140	980	1470
Группа 3	6850	2710	1920	2090	1080	370	350

Примечание. Отличия между группой 3 и группами 1 и 2 статистически достоверны ( $P < 0.05$ ).

Табл. 2. Выделение *M. gallisepticum* из различных отделов респираторного тракта и внутренних органов

	Орган	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4
Респираторный тракт	Трахея	0/14 <sup>a</sup>	14/14	14/14	14/14
	Воздушные мешки	0/14	12/14	10/14	14/14
	Легкие	0/14	10/14	6/14	11/14
	Общее количество реинфекций	0	36 <sup>b</sup>	30	39
Внутренние органы	Печень	0/14	4/14	0/14	3/14
	Селезенка	0/14	3/14	0/14	4/14
	Почки	0/14	8/14	6/14	7/14
	Сердце	0/14	3/14	0/14	3/14
	Общее количество реинфекций	0	18	6 <sup>c</sup>	17

<sup>a</sup> количество реинфекций микоплазмы/общее число цыплят.

<sup>b</sup> Различия статистически не достоверны для группы 2 против групп 3 и 4.

<sup>c</sup> Различия статистически достоверны для группы 3 против групп 2 и 4,  $P \leq 0.01$ .

ных доз индуктора, что является немаловажным в случаях, когда продукты экспрессируемых генов являются токсичными.

В работе использовались самки мышей линии BALB/c 6–8 недельного возраста, вес 18–22 г.

До инфицирования *M. hominis* мышам вводили эстрадиол (Intervet UK, Великобритания) в дозе 0.5 мг на мышью подкожно в объеме 0.1 мл четырехкратно с недельным интервалом. Прогестерон (Depo-Provera, Великобритания) в дозе 2.5 мг на мышью вводили подкожно в объеме 0.1 мл за четыре дня до инфицирования *S. trachomatis*.

Суспензию *M. hominis* (титр  $10^9$  клеток/мл) вводили мышам интравaginaльно в объеме 50 мкл с использованием после второй инъекции эстрадиола. Фракцию элементарных телец *S. trachomatis* (титр  $10^6$  IFU/мл) (IFU-inclusion forming unit, включение-образующие единицы) вводили мышам интравaginaльно в объеме 50 мкл после инъекции прогестерона. Рекомбинантный плазмидный вектор pBI/mel2/rtTA вводили интравaginaльно с использованием Efectene Transfection Reagent (Qiagen GmbH, Германия). Рекомбинантный вектор вводился двукратно: за 24 ч до заражения *M. hominis* или *S. trachomatis* и через 14 дней после заражения в количестве 2 мкг ДНК/мышью в объеме 25 мкл

с добавлением 25 мкл масла какао для повышения вязкости суспензии.

В качестве индуктора транскрипции гена мелитина использовался доксициклина гидрохлорид (ICN Pharmaceuticals, Москва, Россия). Препарат вводили мышам, инфицированным *M. hominis* и *S. trachomatis*, интравaginaльно в дозе 2 мкг/мышью и 1 мкг/мышью соответственно в объеме 50 мкл в момент введения вектора.

Животные были разделены на 3 группы (по 6 в каждой группе, 2 независимых эксперимента). Животные в группе № 1 были инфицированы *M. hominis* или *S. trachomatis* без введения плазмидного вектора pBI/mel2/rtTA и доксициклина. Животным в группе № 2 был введен доксициклин в соответствующей дозе с последующим инфицированием *M. hominis* или *S. trachomatis*. Животным в группе № 3 вводился плазмидный вектор pBI/mel2/rtTA и доксициклин с последующим инфицированием *M. hominis* или *S. trachomatis*.

Для определения титра *M. hominis* после введения плазмидного вектора pBI/mel2/rtTA готовили десятикратные разведения смывов из нижних отделов уrogenитального тракта мышей. Для определения титра *S. trachomatis* с использованием реакции прямой флуоресценции, влагалищными смывами инфицировали линию клеток McCoy.

После введения рекомбинантного вектора pBI/mel2/rtTA и последующего инфицирования мышей мы наблюдали ингибирование инфекции *M. hominis*. Результаты приведены на рис. 1. Титр *M. hominis* во влагалищных смывах мышей в контрольной группе № 1 варьировал, снижаясь от 5.9 до 2.4  $\log_{10}$  ccu/мл (ccu – color change unit, цветоизменяющие единицы) в течение 4 недель. В то же время в третьей группе мышей, которым до инфицирования вводился рекомбинантный вектор pBI/mel2/rtTA совместно с доксициклином, титр *M. hominis* находился в пределах от 4.1 до 1.8  $\log_{10}$  ccu/мл.

В случае введения плазмидного вектора pBI/mel2/rtTA и последующего инфицирования мышей *S. trachomatis* уровень ингибирования инфекции составлял от 45 % до 80 % (табл. 1).

Несмотря на то, что мы не обнаружили полного освобождения мышей от микоплазм и хламидий в пределах сроков наблюдения, скорость элиминации возбудителя в группе № 3 была выше, чем в контрольных группах. Так, 3 мыши в группе № 3, инфицированные *M. hominis* были свободны от возбудителя к 21-му дню после инфицирования, в то время как в контрольных группах № 1 и № 2 *M. hominis* выделяли из всех мышей. Что же касается мышей, инфицированных *S. trachomatis*, то к 27-му дню после инфицирования 4 мыши в группе № 3 были свободны от возбудителя.

Необходимо отметить, что мы не получили статистически достоверных отличий в титрах между группами мышей № 1 и № 2, инфицированных *M. hominis* или *S. trachomatis*, что говорит, во-первых, об отсутствии неконтролируемой экспрессии гена мелитина, во-вторых, выбранная нами концентрация индуктора (доксициклина) не влияет на развитие инфекционного процесса.

Для исследования влияния введения рекомбинантного вектора на развитие инфекции *Mycoplasma gallisepti-*

сум 60 цыплят-бройлеров Ross в возрасте 21 день были маркированы, взвешены и разделены на четыре группы по 15 птиц, так чтобы средняя масса тела цыплят в каждой группе достоверно не отличалась на основании Student *t*-test.

Первая группа цыплят не была инфицирована *M. gallisepticum*, и рекомбинантный плазмидный вектор pBI/mel2/rtTA не вводился. Цыплята второй группы были инфицированы *M. gallisepticum*, рекомбинантный плазмидный вектор pBI/mel2/rtTA также не вводился. Цыплятам третьей группы был введен плазмидный вектор за 5 ч до инфицирования *M. gallisepticum*, а также за 24 и 5 ч до инфицирования внутримышечно вводился индуктор транскрипции гена мелитина – доксициклин (ICN Pharmaceuticals, Moscow, Russia) в дозе 0.1 мг на цыпленка в объеме 100 мкл. Цыплятам четвертой группы вводился доксициклин (в такой же дозе и с такими же интервалами) с последующим инфицированием *M. gallisepticum*. Цыплятам этой группы рекомбинантный плазмидный вектор pBI/mel2/rtTA не вводился.

Были проведены клинические, патоморфологические, иммунологические и микробиологические исследования цыплят всех групп.

Через 9 дней после инфицирования у цыплят в группах 1 и 3 никаких респираторных симптомов обнаружено не было. В то же время в группах 2 и 4 у 5 цыплят обнаружился респираторные хрипы. В группе 2 мы наблюдали статистически достоверное снижение средней массы тела цыплят. Наиболее интересным представляется выделение *M. gallisepticum* из внутренних органов цыплят (табл. 2).

Хотя мы не получили достоверных различий в частоте реизоляции *M. gallisepticum* из органов респираторного тракта цыплят групп 2 и 3 (табл. 4), *M. gallisepticum* была выделена только в 6 из 56 образцов внутренних органов, причем ни в одном случае из печени, селезенки и сердца цыплят этой группы *M. gallisepticum* не выделялась.

Несомненно, основным механизмом действия мембрано-активных антимикробных пептидов, приводящим к ингибированию микоплазменных и хламидийных инфекций как в культуре клеток, так и *in vivo*, является их прямое цитотоксическое действие на эти бактерии [5]. Кроме того, показано [6], что обработка *in vitro* микоплазм амфипатическими пептидами, такими как цекропин А, мелитин, маганин 2, приводит к деполяризации их плазматических мембран, изменению морфологии и уменьшению подвижности.

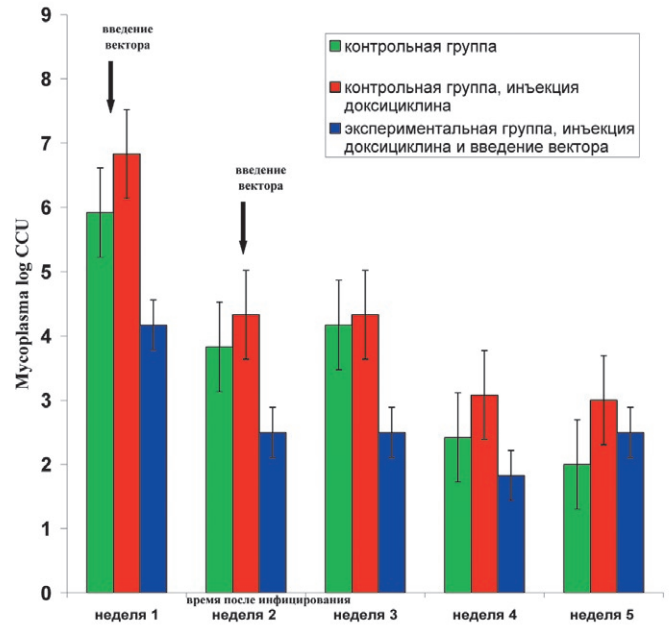


Рис. 1. Влияние введения рекомбинантного плазмидного вектора pBI/mel2/rtTA на динамику выделения *M. hominis* из влагища инфицированных мышей

Ранее нами было показано, что экспрессия гена мелитина в культуре клеток HeLa приводит к снижению трансмембранного потенциала трансфицированной клетки [7], что, в свою очередь, вероятно, нарушает процесс адгезии микоплазм и хламидий к клетке и, таким образом, нарушает нормальный цикл их развития [8]. Кроме того, возможно, экспрессия мелитина приводит к изменениям в цитоскелете клеток и, как следствие, к нарушению внутриклеточного трафика хламидийных включений.

Несмотря на то, что в наших экспериментах не удалось достичь полной элиминации возбудителей из урогенитального и респираторного тракта, эти данные позволяют выдвинуть предположение, что рекомбинантные плазмидные векторы, экспрессирующие гены антимикробных пептидов, можно рассматривать в качестве потенциальных агентов для профилактики и лечения микоплазмозов и хламидиозов. ●

Список литературы.

- Hunter P.A., Reeves D.S., The current status of surveillance of resistance to antimicrobial agents: report on a meeting, J. Antimicrob. Chemoth. 49 (2002) 17-23.
- Finlay B.B., Hancock R.E. Can innate immunity be enhanced to treat microbial infections? Nature Rev. Microbiol. 2004. 2:497-504.
- Bechinger B. Structure and functions of channel-forming peptides: magainins, cecropins, melittin and alamethicin. J. Membr. Biol. 1997. 156:197-211.4. Лазарев В.Н., Шкарупета М.М., Кострюкова Е.С., Титова Г.А., Акопян Т.А., Говорун В.М. Разработка подходов к генной терапии микоплазмозов и хламидиозов с использованием генов антимикробных пептидов. Молекулярная медицина, 2005. № 1. Стр. 60-64.
- Nir-Paz R., Prevost M.C., Nicolas P., Blanchard A., Wroblewski H. Susceptibilities of *Mycoplasma fermentans* and *Mycoplasma hyorhinis* to membrane-active peptides and

- enrofloxacin in human tissue cell cultures. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 2002. 46. 1218-1225.
- Beven L., Castano S., Dufourcq J., Wieslander A., Wroblewski H. The antibiotic activity of cationic linear amphipathic peptides: lessons from the action of leucine/lysine copolymers on bacteria of the class Mollicutes. European Journal of Biochemistry, 2003. 270. 2207-2217.
- Lazarev V.N., Parfenova T.M., Gularyan S.K., Misyurina O.Y., Akopian T.A., Govorun V.M. (2002). Induced expression of melittin, an antimicrobial peptide, inhibits infection by *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma hominis* in a HeLa cell line. International Journal of Antimicrobial Agents, 2002. 19. 133-137.
- Razin S., Jacobs E. (1992). Mycoplasma adhesion. Journal of General Microbiology, 1992. 138. 407-422.

УДК 577.32

# Роль стэкинг-взаимодействий в комплексах белков с аденин- и гуанин-содержащими лигандами

Т. В. Пырков<sup>1, 2#</sup>, Д. В. Пыркова<sup>1</sup>, Е. Д. Балицкая<sup>1, 3</sup>, Р. Г. Ефремов<sup>1</sup><sup>1</sup>Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова<sup>2</sup>Московский физико-технический институт (государственный университет)<sup>3</sup>Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,

#e-mail: pyrkov@nmr.ru

## ВВЕДЕНИЕ

Биологическая функция белков часто определяется взаимодействием с низкомолекулярными соединениями – их лигандами и субстратами. При этом белки выступают, соответственно, в роли рецепторов и ферментов. Знание молекулярных основ взаимодействия рецепторов с лигандами, в частности – пространственной структуры комплекса белок-лиганд, является важнейшей предпосылкой к пониманию функции белка и его роли в биохимических процессах, регулирующих жизнедеятельность клетки. Кроме того, знание такой структуры дает возможность осуществлять на практике рациональное конструирование прототипов лекарственных соединений, которые, как правило, являются лигандами для определенных белков-мишеней в организме.

Инструментальные методы определения пространственной структуры белков и их комплексов с лигандами, такие как рентгеноструктурный анализ и спектроскопия ЯМР,

имеют ряд существенных ограничений. Часто получение структуры комплекса белка с лигандом оказывается затруднительным даже в случае, когда структура самого белка уже известна. Особенно остро проблемы, связанные с экспрессией и кристаллизацией, встают при исследовании трансмембранных белков, которые включают важнейший класс G-белок сопряженных рецепторов. Некоторый оптимизм внушают последние успехи на данном направлении – расшифровка структуры бета-адренергического и аденозинового рецепторов [1].

Технические трудности, сдерживающие применение экспериментальных подходов, привели к развитию методов компьютерного молекулярного моделирования. Одним из таких методов является «докинг» (от англ. docking – стыковка) – алгоритм, позволяющий вписать лиганд в трехмерную структуру белка-рецептора и оценить достоверность предсказанной таким образом структуры комплекса. На сегодняшний день метод до-

кинга активно применяют для исследования структурно-функциональной роли аминокислотных остатков белков, для поиска новых лекарственных соединений, селективно действующих на определенные белки-мишени [2, 3].

Развитие метода докинга происходит за счет применения новых алгоритмов конформационного поиска и новых методов оценки энергии межмолекулярных взаимодействий (оценочных функций, ОФ). ОФ могут иметь различный вид и включать либо термы межмолекулярных взаимодействий, заимствованные из силовых полей [2], либо эмпирические оценки (например, выявление водородных связей по геометрическим параметрам) [4]. В данной работе мы подробно остановимся на стэкинг-взаимодействиях, которые в широко используемых ОФ часто не рассматривают в явном виде.

### ПАРАМЕТРЫ СТЭКИНГ-ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

Среди различных типов контактов в биомолекулярных комплексах (водородные связи, электростатические взаимодействия и др.) стэкинг ароматических фрагментов заслуживает особого внимания. Большинство лекарственных препаратов содержат ароматические циклы, и стэкинг часто играет важную роль в молекулярном узнавании рецептор-лиганд. Ранее мы показали [5], что явный учет стэкинг-взаимодействий существенно повышает эффективность докинга АТФ. Стэкинг-контакты описывали функцией, зависящей от геометрических параметров взаимного расположения двух ароматических фрагментов – высоты  $h$  и угла  $\alpha$  между ними и сдвига  $d$  одного из колец относительно другого (рис. 1).

Диапазон этих параметров, определяющий наличие или отсутствие стэкинга, до сих пор остается не выясненным и в оценочных критериях выбирается достаточно произвольно [6, 7]. Его уточнение могло бы повысить эффективность оценки качества и достоверности структур белок-лиганд, предсказываемых методами молекулярного моделирования. С этой целью мы провели анализ экспериментально установленных пространственных структур атомного разрешения для комплексов различных белков с лигандами, содержащими наиболее распространенные пуриновые основания – аденин и гуанин.

Известный пример стэкинг-взаимодействий – параллельная упаковка азотистых оснований нуклеотидов в ДНК [8, 9]. Но некоторые ароматические соединения стремятся расположиться не только параллельно, но еще и перпендикулярно друг другу, как это показано для аминокислот в белках [7, 10] и в модельных системах, состоящих из простых углеводов – бензола, нафталина [11-14]. Кроме того, такие соединения имеют тенденцию участвовать в  $\pi$ -катионном взаимодействии, при котором образуется контакт между положительно заряженными группами и  $\pi$ -электронным облаком [15-17].

Поэтому мы исследовали распределение параметров  $h$  и  $d$  в зависимости от угла  $\alpha$  относительно азотистого основания лиганда для ароматических боковых цепей остатков Phe, Tyr, Trp и His, а также для положительно заряженных гуанидиновой группы Arg и аминокислотной группы Lys. На рис. 2 приведены результаты для лигандов, содержащих гуанин.

Показано, что для остатка Phe характерны два альтернативных положения над плоскостью гуанинового коль-

Рис. 1. Геометрические параметры, с помощью которых описывали стэкинг-взаимодействия между двумя ароматическими кольцами: смещение ( $d$ ) и высота ( $h$ ) центра одного из циклов относительно другого цикла; угол ( $\alpha$ ) между нормальными к плоскостям циклов

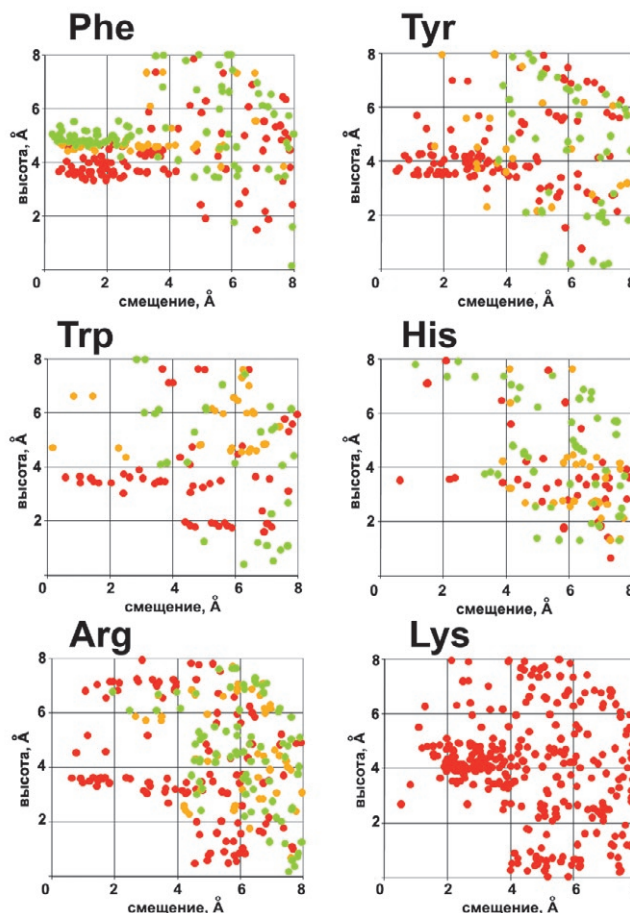
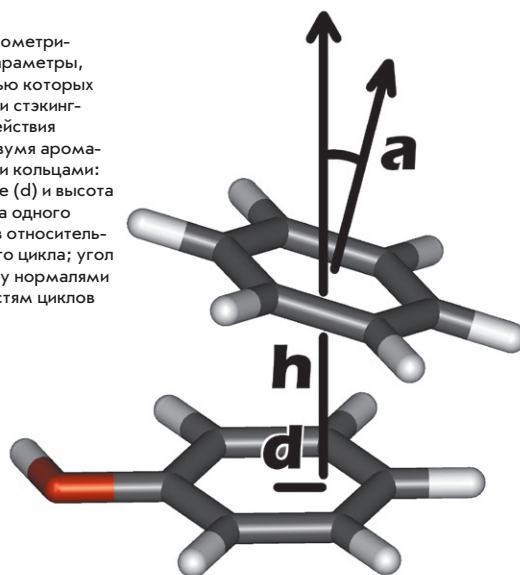


Рис. 2. Распределение центров ароматических колец и положительно заряженных боковых групп аминокислотных остатков белка-рецептора относительно центра гуанинового основания в комплексах белков с гуанин-содержащими лигандами. Красный цвет соответствует  $\cos^2\alpha = 0.0-0.4$  (перпендикулярное расположение), желтый – промежуточным значениям, где  $\alpha$  – угол между плоскостями ароматических циклов. Для Lys угол  $\alpha$  не определен

ца – параллельное и перпендикулярное (на рис. 2 показано красным и зеленым цветом соответственно). Для обоих типов контактов смещение  $d$  может меняться в достаточно большом диапазоне – до 3 Å. При этом два типа контактов хорошо различаются по высоте  $h$ , которая не превышает 4.5 Å для параллельной и 5.5 Å для перпендикулярной ориентации колец. Аналогичные распределения были получены и для остатков Tug, Trp и His, хотя здесь тенденции проследить труднее ввиду меньшей распространенности данных остатков. Кроме того, видно, что для ароматических фрагментов остатков Tug, Trp и His T-образная геометрия не так характерна, как для Phe.

Интересно, что распределение для гуанидиновой группировки Arg очень похоже на Tug, Trp и His с преобладанием параллельной ориентации относительно азотистого основания. Для аминокислот боковой цепи Lys характерно как положение над плоскостью гуанина (π-катионное взаимодействие), так и в его плоскости. Последнее объясняется образованием водородных связей с гетероатомами гуанинового основания.

Для аденина распределения в точности повторяют полученные для гуанина (данные не приведены). Полученные данные по геометрическим параметрам, описывающим стэкинг-взаимодействия, могут в дальнейшем быть использованы при разработке критериев оценки результатов докинга или включены в ОФ, используемые в процессе докинга.

### ГУАНИН-СПЕЦИФИЧНАЯ ОЦЕНОЧНАЯ ФУНКЦИЯ

Эффективность явного учета стэкинг-взаимодействий в ОФ продемонстрировали на примере оценки результатов докинга ГТФ для 14 комплексов с различными белками-рецепторами. Все структуры комплексов, сгенерированные с помощью докинга, были разделены на корректные и неправильные по значению среднеквадратичного отклонения (СКО) по координатам атомов гуанина (см. Методы). Были сконструированы несколько оценочных функций в виде линейной комбинации заранее заданных термов межмолекулярных взаимодействий. При этом все комплексы были разделены на две равные группы – обучающий и тестовый наборы. Весовые коэффициенты при термах подбирали методом линейной регрессии на значения дискретной

функции (1 – корректное решение, 0 – в противном случае) по результатам докинга для 7 комплексов обучающего набора. Для проверки устойчивости полученных весовых коэффициентов использовали метод перекрестной проверки путем изъятия из обучающего набора по одному комплексу. Относительная ошибка для всех коэффициентов при термах составила <30 %, что свидетельствует о надежности полученных результатов.

Новые ОФ были использованы для сортировки структур, сгенерированных с помощью докинга для каждого комплекса по отдельности. Видно, что эффективность ОФ *goldscore* [18], используемой в алгоритме докинга, составляет около 50 % – из возможных 7 корректные структуры выявлены только для 4 и 3 комплексов обучающего и тестового наборов соответственно (табл. 1). Эффективность сортировки по значению термина  $T_{stack}$ , описывающего стэкинг-контакты, выше, чем по ОФ *goldscore*. Комбинирование ОФ *goldscore* и  $T_{stack}$  (ОФ1) также дает лучшие результаты, чем ОФ *goldscore*. Такой же эффект наблюдали при включении термина  $T_{stack}$  в ОФ, учитывающую липофильные контакты и водородные связи гуанин-белок (ОФ2 и ОФ3, табл. 1).

Наиболее эффективной из полученных ОФ является функция ОФ3. Число комплексов, где верное решение ранжировано на первом месте по ОФ3, заметно превышает те же показатели для стандартной функции *goldscore*. При этом также значительно улучшается и средний лучший ранг верного решения, т.е. качество ранжирования повышается в целом равномерно для всех комплексов. Это видно и из анализа результатов, полученных для каждого комплекса (рис. 3).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ структурных данных по комплексам белков с гуанин- и аденинсодержащими соединениями позволил уточнить геометрические параметры стэкинг-взаимодействий лигандов с ароматическими боковыми цепями аминокислотных остатков рецептора. На примере докинга ГТФ было продемонстрировано, что явный учет стэкинг-взаимодействий в оценочных критериях позволяет повысить эффективность поиска достоверных (близких к нативной) структур комплексов белок-лиганд, предсказываемых с помощью методов компьютерного моделиро-

Табл. 1. Ранжирование решений докинга ГТФ

Метод ранжирования	Обучающий набор, 7 комплексов		Тестовый набор, 7 комплексов	
	Число комплексов, где верное решение ранжировано на 1 месте	Средний лучший ранг верного решения	Число комплексов, где верное решение ранжировано на 1 месте	Средний лучший ранг верного решения
<i>goldscore</i>	4	4.7	3	12.1
$T_{stack}$	5	2.3	3	7.0
$ОФ1 = -1.3 + 0.21 \times T_{stack} + 0.016 \times goldscore$	5	1.7	4	6.9
$ОФ2 = 0.06 + 0.007 \times T_{lipophilic} + 0.43 \times T_{h-bond}$	5	2.3	4	6.9
$ОФ3 = 0.05 + 0.004 \times T_{lipophilic} + 0.39 \times T_{h-bond} + 0.22 \times T_{stack}$	6	2.0	5	6.4



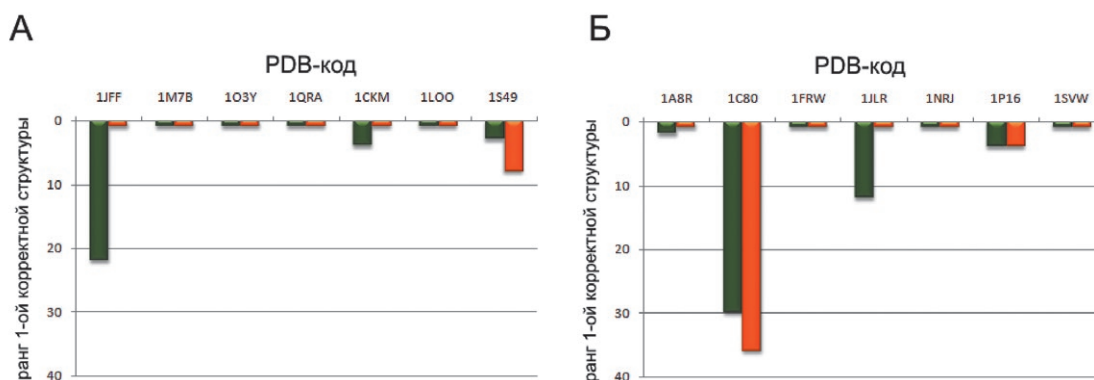


Рис. 3. Эффективность ранжирования результатов докинга ГТФ по ОФ goldscore (зеленый) и ОФ3 (красный) для обучающего (А) и тестового (Б) наборов. Показано лучшее по значению ОФ положение корректной структуры комплекса, сгенерированной с помощью процедуры молекулярного докинга

вания. В дальнейшем полученные результаты могут быть использованы для повышения точности докинга более широкого класса нуклеотид-содержащих соединений.

### МЕТОДЫ

Структуры комплексов гуанин- и аденинсодержащих лигандов с белками были взяты из базы данных PDB (Brookhaven Protein Data Bank) [19]. Веб-сервер PDBlig [20] использовали для поиска записей комплексов, лиганды в которых содержат аденин и гуанин как подструктуру. Лиганды с модифицированными азотистыми основаниями, а также структуры, содержащие цепочки нуклеиновых кислот, не рассматривали. Для выбора представительного набора рецепторов использовали кластеризацию по аминокислотной последовательности с помощью программы Clustalw [21] и выбирали структуру с наилучшим разрешением.

Докинг ГТФ проводили с помощью программы GOLD [18] с использованием функции ранжирования gold-

score. Использовали параметры докинга, установленные по умолчанию. Для каждой структуры белка-мишени было получено по 60 решений докинга. Предсказание докинга считали корректным, если СКО от экспериментальной структуры по координатам атомов гуанина составляло менее 2.5 Å.

Для расчета площади гидрофобного контакта ГТФ-белок (как меры гидрофобного взаимодействия,  $T_{\text{lipophilic}}$ ) использовали веб-сервер PLATINUM [22], смещение шкалы атомных констант гидрофобности взяли равным +0.2 по поверхности лиганда, что позволило более реалистично описать распределение гидрофобных/гидрофильных свойств ГТФ.

Терм  $T_{\text{h-bond}}$  представляет собой дискретную функцию, принимающую значение 1 в случае контакта гуанина с определенным мотивом водородных связей и значение 0 в противном случае. Такими мотивами считали водородные связи атомов N1, N2, O6 гуанина с остатками  $i, i, i$  либо  $i, i, i-2$ . ●

### Список литературы

- Hanson M.A., Stevens R.C. Structure. 2009. 17. 8-14.
- Kitchen D.B., Decornez H., Furr J.R., Bajorath J. Nat. Rev. Drug. Discov. 2004. 3. 935-949.
- Moitessier N., Englebienne P., Lee D., Lawandi J., Corbeil C.R. Br. J. Pharmacol. 2008. 153. S7-S26.
- Eldridge M.D., Murray C.W., Auton T.R., Paolini G.V., Mee R.P. J. Comput. Aided. Mol. Des. 1997. 11. 425-445.
- Pyrkov T.V., Kosinsky Y.A., Arseniev A.S., Priestle J.P., Jacoby E., Efremov R.G. PROTEINS 2007. 66. 388-398.
- Deng Z., Chuaqui C., Singh J. J. Med. Chem. 2004. 47. 337-344.
- Chakrabarti P., Bhattacharyya R. Prog. Biophys. Mol. Biol. 2007. 95. 83-137.
- Gotoh O. Adv. Biophys. 1983. 16. 1-52.
- Sponer J., Leszczynski J., Hobza P. J. Biomol. Struct. Dynam. 1996. 14. 117-135.
- Chelli R., Gervasio F.L., Procacci P., Schettino V. J. Am. Chem. Soc. 2002. 124. 6133-6143.
- Tsuzuki S., Honda K., Uchimaru T., Mikami M., Tanabe K. J. Am. Chem. Soc. 2001. 124. 104-112.
- Small D., Zaitsev V., Jung Y., Rosokha S.V., Head-Gordon M., Kochi J.K. J. Am. Chem. Soc. 2004. 126. 13850-13858.
- Sato T., Tsuneda T., Hirao K. J. Chem. Phys. 2005. 123. 104307.
- Malathy Sony S.M., Ponnuswamy M.N. Crystal Growth & Design 2006. 6. 736-742.
- Waters M.L. Curr. Opin. Chem. Biol. 2002. 6. 736-741.
- Meyer E.A., Castellano R.K., Diederich F. Angew. Chem. Int. Ed. 2003. 42. 1210-1250.
- Tewari A.K., Dubey R. Bioorg. Med. Chem. 2008. 16. 126-143.
- Jones G., Willett P., Glen R.C., Leach A.R., Taylor R.D. J. Mol. Biol. 1997. 267. 727-748.
- Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E. Nucleic. Acid. Res. 2000. 28. 235-242.
- Chalk A.J., Worth C.L., Overington J.P., Chan A.W. J Med Chem. 2004. 47. 3807-3816.
- Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G. Bioinformatics. 2007. 23. 2947-2948.
- Pyrkov T.V., Chugunov A.O., Krylov N.A., Nolde D.E., Efremov R.G. Bioinformatics. 2009. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp111

# Правила для авторов

## ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Журнал «Acta Naturae» публикует экспериментальные и обзорные статьи, а также проблемные статьи, мини-обзоры, краткие сообщения, посвященные наиболее актуальным вопросам фундаментальных и прикладных наук о живом и биотехнологий.

Редакция журнала «Acta Naturae» просит авторов руководствоваться приведенными ниже правилами. Статьи, оформленные без соблюдения этих правил, возвращаются авторам без рассмотрения.

Объем статьи не должен превышать 20 страниц формата А4. В этот объем входят текст статьи, таблицы, библиография, подписи к рисункам. Число рисунков и таблиц не должно составлять более 10. Статьи большего объема принимаются только после предварительного согласования с редакцией.

Объем краткого сообщения не должен превышать 8 страниц формата А4. В этот объем входят текст, таблицы, библиография (не больше 12 источников) и рисунки, число которых не должно превышать четырех, включая обозначения а, б. Каждый рисунок должен сопровождаться подписью независимо от того, имеется ли в тексте его описание.

Рукопись следует оформить одним файлом в соответствии с требованиями, приведенными ниже. Рукопись обязательно должна быть подписана всеми авторами. Рукопись направляется в редакцию в виде электронной версии.

Если пересылаемый материал велик по объему, следует использовать архиватор .ZIP. В качестве электронных носителей могут быть использованы CD-ROM.

## ОФОРМЛЕНИЕ РУКОПИСЕЙ

Рукопись должна быть построена следующим образом:

- УДК в левом верхнем углу, шрифт – обычный, размер 12.
- Название статьи. Шрифт – заглавный, полужирный. Заглавие не должно быть слишком длинным или коротким и малоинформативным. Оно должно отражать главный результат, суть и новизну работы.
- Инициалы и фамилии авторов. Автор, ответственный за переписку с редакцией, включая работу с корректурой, выделяется сноской, внизу первой страницы рукописи приводится электронный адрес для переписки.
- Полное название научной организации и ее ведомственная принадлежность.
- Аннотация (резюме). Структура резюме должна быть предельно четкой и отражать следующие особенности выполненной авторами работы: постановка проблемы и обоснование выбора объекта исследования; обоснование выбора методического подхода и стратегии исследования; полученные результаты с четким указанием их новизны по сравнению с уже известными; следствия, вытекающие из этих результатов (новая гипотеза, опровержение известной гипотезы, возможность практических приложений, возможность постановки новых задач). Средний объем аннотации составляет 20 строк. Ее размер зависит от степени новизны описываемых в статье результатов. Сокращения в аннотации не допускаются.
- Ключевые слова. В них следует отразить: предмет исследования, метод, объект, специфику данной работы.
- Заглавие статьи на английском языке.
- Фамилии и инициалы авторов в английской транскрипции с пометками, указывающими на организацию, в которой работают авторы.
- Полное название научной организации и ее ведомственная принадлежность на английском языке.
- Раздел «Экспериментальная часть».
- Раздел «Результаты исследования».
- Раздел «Обсуждение результатов и выводы». В конце раздела указываются названия организаций, финансировавших работу, в скобках – номера грантов.
- Раздел «Список литературы». Список литературы приводится на отдельной странице. Ссылки в тексте на цитируемую литературу даются в квадратных скобках, например [1].
- Аннотация (резюме) на английском языке, являющаяся переводом аннотации (резюме) на русском языке.

## РЕКОМЕНДАЦИИ ПО НАБОРУ И ОФОРМЛЕНИЮ ТЕКСТА

- Рекомендуется использование редактора Microsoft Word 2003 for Windows.

- Нежелательно использование макросов.
- Рекомендуемый шрифт – Times New Roman. Стандартный размер шрифта – 12.
- Нецелесообразно использовать более одного пробела между словами.
- Не следует использовать редактор формул MathType, пользуйтесь стандартным редактором формул MS Word.
- 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.
- Строки в пределах абзаца не должны разделяться символом возврата каретки (обычно клавиша Enter). Тексты с разделением строк в пределах абзаца символом возврата каретки не могут быть использованы.
- Между инициалами и фамилией всегда ставится пробел: А. А. Иванов (кроме перечисления авторов в заглавии статьи, где пробелы ставятся и между инициалами – А. А. Иванов).
- Во всем тексте, кроме даты поступления, все даты в виде «число.месяц.год», набираются следующим образом: 02.05.1991, 26.12.1874 и т.п.
- Точка не ставится после: «УДК», заглавия статьи, авторов, адресов, заголовков и подзаголовков, названий таблиц, размерностей (с – секунда, г – грамм, мин – минута, сут – сутки, град – градус).
- Точка ставится после: сноска (в том числе в таблицах), примечаний к таблице, подписей к рисункам, краткой аннотации, сокращений (мес. – месяц, г. – год, т. пл. – температура плавления) (но не ставятся в подстрочных индексах:  $T_{m, n}$  – температура плавления,  $T_{ф, n}$  – температура фазового перехода). Исключение: млн – миллион – без точки.
- Десятичные цифры набираются только через точку, а не через запятую (0,25 вместо 0,25).
- Знак «-» (тире) отбивается пробелами, знаки «минус», «интервал», или «химическая связь» пробелами не отбиваются.
- В качестве знака умножения используется только «×». Знак «x» 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".
- Буква «ё» везде заменяется на «е», кроме фамилий и особых случаев.
- Числовой материал представляется в виде таблиц.
- В формулах используются буквы латинского и греческого алфавитов.
- Латинские названия родов и видов живого мира пишутся курсивом, таксонов более высокого ранга – прямым шрифтом. Названия вирусов и бактериофагов в латинской транскрипции пишутся прямым текстом.
- 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 (Т34, Ala89).
- При выборе единиц измерения необходимо придерживаться международной системы единиц СИ.
- Молекулярная масса выражается в дальтонах (Да, кДа, МДа).
- Количество пар нуклеотидов обозначается сокращениями (п.н., т.п.н.).
- 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.
- Иллюстрации должны предоставляться в двух экземплярах: для цветной верстки и для черно-белой

- Иллюстрации должны иметь разрешение не ниже 250 dpi для цветных и полутоновых изображений и не менее 600 dpi для черно-белых иллюстраций
- Недопустимо сохранение в файлах неиспользуемых путей обротов и дополнительных каналов (Path и Alpha Channel), также недопустимо использование дополнительных слоев.
- форматы файлов – Adobe Photoshop до 6.0. включительно TIFF, EPS, DCS 1.0, DCS 2.0 (без дополнительных каналов), PSD (текстовые слои должны быть отрастрированы)

## ОФОРМЛЕНИЕ СПИСКА ЛИТЕРАТУРЫ

- Список цитируемой литературы печатается с указанием фамилий и инициалов всех авторов как отдельный раздел рукописи.
- Инициалы ставятся после фамилий авторов и редакторов и не разделяются пробелами между собой: Иванов А.А., Petrov B.B.
- Год, том, номер журнала и т.п. разделяются между собой и отделяются от соответствующих цифр запятыми: 1992, T.29, No2, C.213. или 1992, V.29, No2, P.213.
- Для обозначения номера как русского, так и иностранного журнала употребляется «№». В названиях журналов слово «журнал» сокращается до Журн.

## РЕЦЕНЗИРОВАНИЕ, ПОДГОТОВКА РУКОПИСИ К ПЕЧАТИ, ОЧЕРЕДНОСТЬ ПУБЛИКАЦИИ

Статьи публикуются по мере поступления. Очередность публикации устанавливается по дате принятия статьи к печати. Члены редколлегии имеют право рекомендовать к ускоренной публикации статьи, отнесенные редколлекцией к приоритетным и получившие высокую оценку рецензентов.

Статьи, поступившие в редакцию, проходят экспертизу членов редколлегии и при необходимости направляются на внешнее рецензирование. Выбор рецензента является прерогативой редакции. Рукопись направляется на отзыв специалистам в данной области исследований, и по результатам рецензирования редколлегия определяет дальнейшую судьбу рукописи: принятие к публикации в представленном виде, необходимость доработки или отклонения.

Решением редакционной коллегии статья может быть отклонена, если она не удовлетворяет перечисленным выше требованиям.

Рукопись, направленная автором на доработку по замечаниям рецензентов и редакторов, рецензируется повторно, после чего редколлегия вновь решает вопрос о приемлемости ее для публикации. В начале публикуемой статьи приводятся даты первоначального поступления рукописи в редакцию и после окончательной доработки.

Возвращение рукописи авторам на доработку не означает, что статья принята к печати. После получения доработанного текста рукопись вновь рассматривается редколлекцией. Доработанный текст автор должен вернуть вместе с первоначальным экземпляром статьи, а также ответами на все замечания. Датой поступления считается день получения редакцией окончательного варианта статьи.

Переработанная рукопись должна быть возвращена в редакцию в течение 12 недель после получения авторами отзывов; в противном случае рукопись рассматривается как вновь поступившая.

Рукопись, получившая недостаточно высокие оценки при рецензировании, отклоняется как не соответствующая уровню или профилю публикаций журнала.

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

Через месяц после сдачи очередного выпуска журнала на макетирование редакция рассылает авторам по электронной почте корректуры статей в виде PDF файла с сопроводительным письмом, где описан порядок работы с корректурой.

На стадии корректуры не допускаются замены текста, рисунков или таблиц. Если это все же необходимо, то вопрос решается редколлекцией; в крайнем случае статья снимается из номера. ●

# «ЖИВЫЕ СЛОВА»



**ПРИЕМ РАБОТ С 6 АПРЕЛЯ ПО 15 СЕНТЯБРЯ**

## НОМИНАЦИИ:

«Золотое перо фундаментальной науки» (в области живых систем)

Премии:

I премия — 15 000 рублей.

II премия — 10 000 рублей.

III премия — 5 000 рублей.

«Лучшее освещение исследований по биотехнологиям»

Премии:

I премия — 15 000 рублей.

II премия — 7 000 рублей.

«Лучшее представление научного коллектива»

I премия — 10 000 рублей.

«Портрет ученого»

I премия — 10 000 рублей.

«Новые горизонты живых систем»

I премия — 15 000 рублей.

«Народное признание»

I премия — 15 000 рублей.

Победитель в каждой из номинаций определяется путем свободного голосования за работу на сайте [www.strf.ru](http://www.strf.ru)

## ОРГАНИЗАТОРЫ

Биологический факультет  
МГУ имени М.В.Ломоносова

«Наука и технологии России — STRF.ru»

## ПРИ ПОДДЕРЖКЕ

Министерства образования и науки России,  
Федерального агентства по науке и инновациям

**Подробная информация:**

Тел.: +7 (495) 930 8850, 930 8707

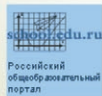
E-mail: [article@strf.ru](mailto:article@strf.ru)

[WWW.STRF.RU](http://WWW.STRF.RU)

ГЕНЕРАЛЬНЫЙ ИНФОРМАЦИОННЫЙ ПАРТНЕР



ГЛАВНЫЙ ИНФОРМАЦИОННЫЙ ПАРТНЕР



# Наука и технологии России – STRF.ru



**40%** учёных согласны с тем, что публикации о результатах научной работы способствуют просвещению общества, росту престижа профессии учёного, улучшению имиджа науки

**34%** считают, что, распространяя информацию о результатах своей работы, они смогут привлечь клиентов, партнёров, деньги

**12%** надеются, что публикации о результатах исследований помогут им выделиться на фоне коллег и конкурентов...  
...при этом

**17%** учёных никогда не общались с журналистами\*

Откройте миру свои открытия