

# От редакции

Последние месяцы уходящего года были отмечены повышенным интересом представителей власти, депутатского корпуса и СМИ к проблемам развития отечественного биофармрынка, биотехнологии. Даже простое перечисление фактов и дат свидетельствует о том, что руководство страны решило серьезно подойти к возрождению технологического потенциала страны в этой области. Проведение заседания Комиссии при Президенте по модернизации и технологическому развитию российской экономики на базе биотехнологического предприятия в г. Покрове с одновременным визитом непосредственно на технологический участок по производству инновационных лекарственных препаратов Президента страны Д.А. Медведева, визит премьер-министра В.В. Путина на фармацевтическое предприятие по производству рекомбинантных белковых лекарственных препаратов в г. Зеленоград. 15 октября 2009 года в Государственной Думе ФС РФ состоялись Парламентские слушания на тему «О совершенствовании законодательного обеспечения биотехнологической отрасли промышленности». Мероприятие проводилось по инициативе Комитета по промышленности Государственной Думы. Состоялось заседание отраслевых научно-технических советов с участием представителей Минобрнауки и Минпрома, и, наконец, в послании Президента Федеральному собранию страны имелся значительный раздел, посвященный биофармацевтике.

Общеизвестно, что Советский Союз в «доперестроечную» эпоху занимал одно из лидирующих мест в мире по уровню развития биотехнологической отрасли. Многие были достигнуты благодаря опережающим темпам развития академической и отраслевой «бионауки», сумевшей воспрянуть в относительно краткий период «пост-лысенковского» развития. К сожалению, этот период созидания, как и многие направления научно-технического прогресса, был прерван революционными событиями рубежа 90-х годов. В настоящее время вопрос о возрождении «наук о жизни» и непосредственно связанных с ним инновационных областей биотехнологии и биофарминдустрии ставится очень остро.

Речь действительно идет о национальной безопасности страны и возможности России участвовать в международном разделении труда в этой сфере в XXI веке. Дискуссии в основном сосредотачиваются в области совершенствования путей развития бионауки и биотехнологии, в частности, они касаются рецептов повышения эффективности труда исследователей и приближения их по ряду основных показателей (публикации в высокорейтинговых научных журналах, цитируемости, возможности патентования оригинальных разработок) к ведущим мировым центрам. Ставится вопрос о путях развития биотеха в рамках Госкорпорации или частных компаний. Возможно разумное сочетание инвестиций, однако пути внедрения разработок и ускорение этого процесса представляются весьма смутными. Весьма остро стоит также вопрос об экспертизе проектов. После снятия политических барьеров у российских исследователей не стало формальных ограничений к выезду за рубеж. Проблемы 90-х породили массовую иммиграцию ученых, больно ударившую и по биотехнологической отрасли. В этой связи ставится конкретный вопрос – можно ли ориентироваться на «реиммиграцию», т.е., следуя опыту Китая, добиваться возвращения соотечественников для поднятия отрасли? Наряду с глобальными проблемами, вставшими перед руководством страны, учеными, бизнес-сообществом в связи с поставленными задачами, есть ряд конкретных вопросов, требующих незамедлительного решения. Многие из них связаны с таможенным регулированием и доставкой биологических препаратов, необходимых сред для культивирования, клеточных линий и линейных животных. В настоящее время процесс доставки этих объектов на территорию РФ крайне затруднен, а в ряде случаев (как, например, препаратов, содержащихся в условиях низких температур) практически невозможен. Необходимо также учитывать, что приборы, материалы, технологическое оборудование, получаемые по импорту, на территории РФ для российских потребителей значительно дороже, чем аналогичные объекты в странах Европы и США. Это делает крайне затруднительным процесс развития биоотрасли в России в условиях конкуренции с Западом.

Все сказанное обусловило решение редколлегии посвятить раздел «Форум» настоящего номера журнала проблемам биофармы. Мы отобрали статьи авторов из мира науки, бизнеса, представителей СМИ – нам показалось интересным представить спектр мнений разных людей о перспективах развития биоотрасли в России и оценки современного состояния проблемы. ●

К.Г. Скрыбин, Е.Б. Прохорчук, А.М. Мазур, Е.С. Булыгина, С.В. Цыганкова, А.В. Недолужко, С.М. Расторгуев, В.Б.Матвеев, Н.Н. Чеканов, Д.А.Горанская, А.Б. Теслюк, Н.М. Груздева, В.Е. Велихов, Д.Г. Заридзе, М.В. Ковальчук

## Комбинирование двух технологических платформ для полногеномного секвенирования человека

В данном исследовании впервые в России было проведено полногеномное секвенирование человека с использованием двух из представленных на современном рынке технологий – циклического лигазного секвенирования SOLiD и технологии секвенирования на молекулярных кластерах с использованием флуоресцентно меченных предшественников. Был установлен оптимальный алгоритм использования новейших методов определения первичной последовательности ДНК при секвенировании индивидуальных геномов человека

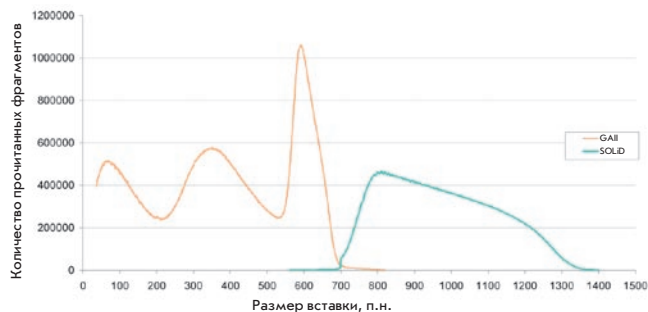


График распределения расстояний между парными чтениями для библиотек референсного генома hg18

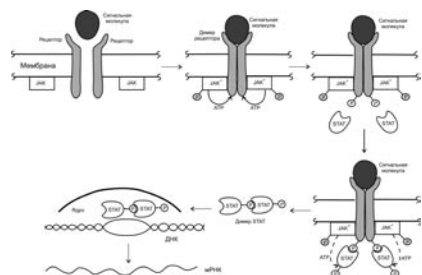


Схема передачи сигнала через мембранные рецепторы, ассоциированные с киназами системы JAK

Д.Г. Кнорре, Н.В. Кудряшова, Т.С. Годовикова

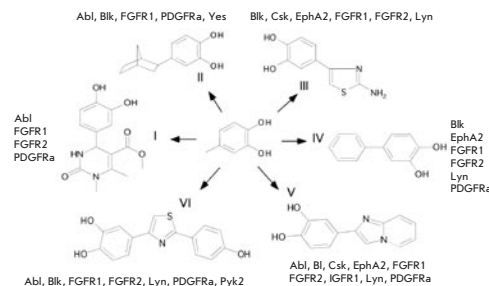
## Химические и функциональные аспекты посттрансляционной модификации белков

В обзоре рассмотрены химические и функциональные аспекты посттрансляционной модификации белков, получаемые присоединением различных групп к боковым радикалам аминокислотных остатков полипептидного остова белков. Значительное внимание уделено участию посттрансляционной модификации белков в регуляции биохимических процессов в живых организмах

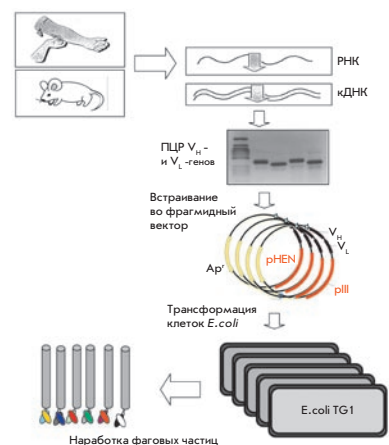
Т.В. Ракитина, О.В. Юдина, Е.В. Смирнова, А.В. Липкин

## Панель тирозиновых киназ как инструмент для разработки противораковых препаратов

Целью данной работы было создание панели функционально активных тирозиновых киназ и поиск ингибиторов в коллекции низкомолекулярных соединений. Анализ результатов скрининга с помощью молекулярного моделирования позволил предположить, что 2-гидроксифенольная группа является перспективной основой для создания новых ингибиторов онкогенных тирозиновых киназ.



Ингибиторы тирозиновых киназ, найденные при скрининге химической коллекции



Н.В. Тикунова, В.В. Морозова

## Фаговый дисплей на основе нитчатых бактериофагов: применение для отбора рекомбинантных антител

Дисплей пептидов и белков на поверхности нитчатых бактериофагов является мощной методологией для отбора пептидов и белковых доменов, включая антитела. Преимущество этой методологии заключается в прямой физической сцепленности фенотипа и генотипа – анализируемого полипептида и кодирующего его фрагмента ДНК. Настоящий обзор является введением в методологию фагового дисплея; в обзоре более детально представлен дисплей рекомбинантных антител

Схема конструирования фаговой библиотеки фрагментов антител

## Учредители:

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

## Редакционный совет:

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

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

## Редакционная коллегия:

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

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

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

*Руководитель проекта:* Р.Р. Петров

*Выпускающий редактор:* Е.В. Дорогова

*Научный редактор:* В.В. Сычев

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

*Корректур:* М.В. Чуланова

*Дизайн-проект:* Х. Шнайдер

Адрес редакции: 119991, Москва, Ленинские горы,  
Научный парк МГУ, владение 1, строение 75Г.  
Телефон/факс: +7 (495) 930 80 06.

E-mail: knorrevd@gmail.com, rpetrov@strf.ru, vsychev@strf.ru

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

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

© ACTA NATURAE, 2009

Номер подписан в печать 5 декабря 2009 г.  
Тираж 800 экз. Цена свободная.

Отпечатано по заказу РА «Real Profit Media»  
в типографии ООО «Принт Сэйл»

От редакции. . . . . 1

## ФОРУМ

А.И. Гордеев  
**Фармацевтическая промышленность России:  
реалии и перспективы. . . . . 6**

Алексей Конов, Андрей Леонов  
**Биофарма:  
как преодолеть «долину смерти»  
между НИР и внедрением? . . . . . 11**

**Рецепт для российского инсулина . . . . . 18**

## ОБЗОРЫ

Н.В. Тикунова, В.В. Морозова  
**Фаговый дисплей на основе нитчатых  
бактериофагов: применение для отбора  
рекомбинантных антител. . . . . 22**

Д. Г. Кнорре, Н.В. Кудряшова, Т.С. Годовикова  
**Химические и функциональные  
аспекты посттрансляционной  
модификации белков . . . . . 32**

В.П. Пузырев, М.Б. Фрейдин  
**Генетический взгляд на феномен  
сочетанных заболеваний человека . . . . . 57**

А.П. Григоренко, С.А. Боринская, Н.К. Янковский,  
Е.И. Погаев  
**Достижения и особенности в работе  
с древней ДНК и ДНК из сложных  
криминалистических образцов. . . . . 64**

В.С. Баранов  
**Геномика на пути  
к предиктивной медицине . . . . . 77**

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

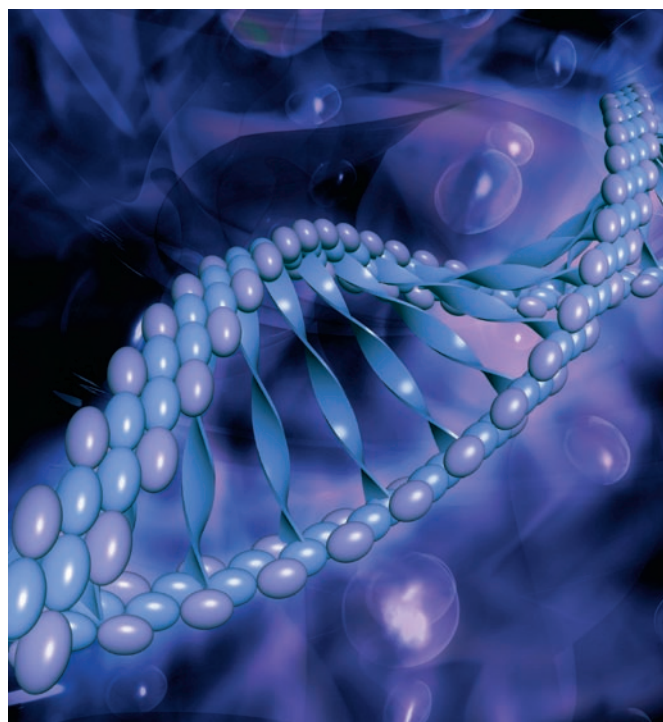
- Н.М. Новожилова, Н.В. Бовин  
**Метаболизм D-арабинозы: характеристика бифункциональной арабинокиназы/пирофосфорилазы *Leishmania major* . . . . . 90**
- Т. В. Ракитина, О.В. Юдкина, Е.В. Смирнова, А.В. Липкин  
**Панель тирозиновых киназ как инструмент для разработки противораковых препаратов . . . . . 93**
- И.Г. Шабалин, К.М. Поляков, В.И. Тишков, В.О. Попов  
**Пространственная структура НАД<sup>+</sup>-зависимой формиатдегидрогеназы из бактерий *Moraxella sp. C-1* при атомном разрешении . . . . . 98**
- И.В. Шаповалова, В.Б.Л. Алкема, О.В. Ямскова, Э. де Врис, Д.Ф. Гуранда, Д.Б. Янссени В.К. Швядас  
**Мутация остатка  $\beta$ F71 в структуре пенициллинацилазы из *Escherichia coli* приводит к улучшению энантиоселективности и каталитических свойств . . . . . 103**
- Л.К. Рамайя, К.Г. Орджоникидзе, Е.М. Егорова, А.В. Рубанович  
**Генотоксические эффекты наночастиц серебра при воздействии на млекопитающих *in vivo* . . . . . 109**
- К.Г. Скрыбин, Е.Б. Прохорчук, А.М. Мазур, Е.С. Булыгина, С.В. Цыганкова, А.В. Недолужко, С.М. Расторгуев, В.Б. Матвеев, Н.Н. Чеканов, Д.А. Горанская, А.Б. Теслюк, Н.М. Груздева, В.Е. Велихов, Д.Г. Заридзе, М.В. Ковальчук  
**Комбинирование двух технологических платформ для полногеномного секвенирования человека . . . . . 113**
- Н.И. Гринева, Т.В. Ахлынина, Л.П. Герасимова, Т.Е. Манакова, Т.Г. Сарычева, Д.А. Шмаров, А.М. Тимофеев, Н.М. Найденова, Л.Ю. Колосова, Т.И. Колошейнова, Л.Г. Ковалева, С.В. Кузнецов, А.В. Воронцова, А.Г. Туркина  
**Клеточная регуляция пролиферации и дифференцировки *ex vivo* клеток, содержащих Ph хромосому, при хроническом миелолейкозе . . . . . 120**

Е.В. Громенко, П.В. Спирин, Е.А. Кубарева, Е.А. Романова, В.С. Прасолов, О.В. Шпанченко, О.А. Донцова

**Дезаминирование остатков 5-метилцитозина в клетках млекопитающих . . . . . 134**

Э.С. Пирузян, В.В. Соболев, Р.М. Абдеев, А.Д. Золотаренко, А.А. Николаев, М.К. Саркисова, М.Е. Саутин, А.А. Ишкин, Ан.Л. Пирузян, С.А. Ильина, И.М. Корсунская, О.Ю. Рахимова, С.А. Брускин

**Изучение молекулярных механизмов патогенеза иммуноопосредованных воспалительных заболеваний на примере псориаза. . . . . 139**



**РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ**

*Bigstockphoto.com/STEELCOAST CREATIVE/Sean Acierno*

# Фармацевтическая промышленность России: реалии и перспективы

А.И. Гордеев, Фонд «Открытая экономика»

Нынешний раздел «Форум» посвящен фармацевтической промышленности России – к этой теме нас подтолкнуло появление и последующее активное обсуждение Стратегии развития фармацевтической промышленности Российской Федерации до 2020 г., разработанной по заказу Министерства промышленности и торговли Российской Федерации. Подавляющее большинство опрошенных экспертов – представителей федеральных органов исполнительной власти, бизнеса, академической и отраслевой науки считают, что России необходима полноценная фармацевтическая промышленность. Каковы главные аргументы в пользу интенсивного развития отечественной фармацевтической промышленности? На наш взгляд, все их разнообразие сводится к четырем основным доводам.

## 1. НАЦИОНАЛЬНАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ

С точки зрения большинства экспертов, в число самых веских аргументов входит обеспечение национальной безопасности. В первую очередь речь идет о бесперебойном снабжении готовыми лекарственными средствами (ГЛС) населения страны в случае наступления каких-то критических ситуаций. Это действительно серьезная теоретическая посылка, но здесь необходимо учитывать, что на уровне простейших лекарственных препаратов наша фармацевтическая промышленность сможет обеспечить население страны в любой ситуации. По статистике и по данным опросов ряда ведущих клиник, проведенных изданием STRF.ru, доля российских препаратов в номенклатуре лекарств дости-

гает порядка 70 %, но при этом нужно учитывать, что российское производство субстанции для изготовления этих препаратов активно заменяется на импортные закупки. Да, российских препаратов почти нет среди новейших, инновационных ГЛС, но это не является определяющим фактором в случае преодоления последствий природных или военных катастроф. Другое дело, что вопросы национальной безопасности имеют не столько военно-политический контекст, сколько экономический. Импортозамещение, особенно в условиях валютной нестабильности, является очевидным приоритетом государственной социальной политики, так как напрямую затрагивает базовые конституционные ценности.

## 2. РАЗВИТИЕ ВЫСОКИХ ТЕХНОЛОГИЙ И ЭКОНОМИКИ

Фармацевтическая промышленность считается одной из самых высокотехнологичных. Следовательно, ее развитию, как минимум, стоит уделять серьезное внимание на пути реализации государственной политики по изменению структуры российской экономики, смещая ее от сырьевых к высокотехнологичным отраслям. Основания для повышенного внимания государства дают экономические показатели российского фармацевтического рынка – объем, динамика, наличие устойчивого спроса. Причем эти показатели достигаются небольшим количеством занятых в отрасли работников (65–70 тысяч). Сила любой высокотехнологичной отрасли в том, что ее конкурентное развитие существенным образом стимулирует научные исследования. Новации, которые обеспечивает фармацевтическая промышленность, являются результатом достижений биологических и медицинских наук. Развитие фармацевтики способствует развитию химии, физики, математики и т.д., что, в свою очередь, обеспечивает образовательным учреждениям дополнительный спрос на выпуск высококвалифицированных специалистов. Таким образом, можно утверждать, что сильная фармацевтическая промышленность обеспечивает спрос на результаты исследований и разработок академических и отраслевых научных организаций, а также способствует росту экономической занятости. С одной стороны, фармпредприятия получают от медицины заказ на производство тех или иных ле-



Александр Игоревич Гордеев

карств, получают информацию о ведущихся разработках, с другой стороны, компании сами подталкивают эти разработки и формулируют заказ ученым, предлагают новые идеи. Тем самым они влияют и на фундаментальные исследования, и на прикладные разработки. На всех этапах инновационной цепочки – от научных исследований до разработок технологий и непосредственно производства – необходима хорошо образованная, владеющая современными технологиями рабочая сила.

### 3. ПОВЫШЕНИЕ КАЧЕСТВА ЖИЗНИ НАСЕЛЕНИЯ

В масштабах государства фармацевтическая отрасль выступает в качестве посредника, реализующего ряд социальных функций, направленных на улучшение качества и продолжительности жизни населения Российской Федерации. Разумеется, данные функции не могут полноценно реализовываться, когда мы не имеем технологий, не имеем той созидательной силы, которая побуждает проводить все новые и новые исследования. Не создавая и не используя высокие технологии, не владея достаточным их количеством, не владея инфраструктурой для постоянного воспроизводства инноваций в этой области,

нельзя добиться серьезного повышения качества медицинского обслуживания. Да, в России будут проводиться научные исследования, появляться новые знания, но доминирование импортных инноваций отрезает путь к развитию инфраструктуры производства новых лекарств и разработки новых методов лечения людей. Отсутствие связующего звена – полноценной фармотраслы – детерминирует низкое качество медицинского обслуживания, невостребованность целых областей науки. Безусловно, мы можем повторять и использовать имеющиеся за рубежом наработки. Но с лучшими из них легально работать мы не сможем, нам сейчас продают то, что за рубежом уже вышло «в тираж». Иными словами, граждане России обрекаются на медицину «второго сорта» в случае прекращения импорта инновационных лекарственных средств.

### 4. ВЫХОД НА МЕЖДУНАРОДНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ РЫНОК

В последние годы Россия потеряла практически все свои позиции на международном рынке товаров фармацевтической и биотехнологической отраслей. Восстановление присутствия на таком рынке – еще один существенный шаг от «сырьевой экономики» к качественно иному участию в международном разделении труда.

### КЛЮЧЕВЫЕ ПРОБЛЕМЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

Что представляет собой проект стратегии «Фарма-2020»? Если не сосредоточиваться на деталях, то перед нами отраслевая стратегия, нацеленная на поддержку российских фармацевтических компаний (под «российскими фармацевтическими компаниями» понимаются предприятия любой организационно-правовой формы, которые обеспечивают на территории России полный цикл производства лекарств). «Фарма-2020» строилась с учетом перспектив растущего рынка отечественной фарминдустрии, соответственно оценивалась и целесообразность вложения государственных ресурсов в ее развитие. Авторы стратегии ее основной целью заявляют создание

условий для «перехода на инновационную модель развития» российской фармацевтической промышленности, но при этом достаточно схематически обозначают как механизмы, так и инструменты, обеспечивающие такой переход. Это не удивительно, так как создавалась именно стратегия отраслевого типа в условиях, когда обеспечить межведомственную координацию и согласование различных отраслевых подходов на практике невозможно. Стратегия фактически никак не затрагивает «пограничные» вопросы: медицинского обслуживания населения, иных программ развития науки и технологий, новых правовых отношений, возникающих при взаимодействии науки, бизнеса и производства. Каковы же узловые точки, на которых необходимо сфокусировать внимание и которые окажутся решающими для успеха или неуспеха при реализации стратегии?

### 1. НЕПРОРАБОТАННОСТЬ МЕХАНИЗМОВ ФИНАНСИРОВАНИЯ ИННОВАЦИЙ

Инновационная составляющая (а именно ей мы намерены уделить особое внимание в рамках этого сборника) является ключевой в становлении полноценной фармацевтической промышленности. Есть ли на это средства? Мировая фармацевтическая отрасль занимает второе место по объемам инвестиций в исследования и разработки. Такой вывод содержится в аналитическом обзоре «R&D Scoreboard 2006», подготовленном министерством торговли и промышленности Великобритании, представляющем информацию о 800 английских и 1250 мировых компаниях, которые больше всего вкладывают в НИОКР. Фармацевтические компании заняли ступень между производителями аппаратных средств (technology hardware, первое место) и автомобилестроителями (третье место), а компании, занимающиеся созданием программного обеспечения (software), оказались на пятом месте.

### 2. ОТСУТСТВИЕ КАЧЕСТВЕННОГО ПРАВОВОГО РЕГУЛИРОВАНИЯ, СТИМУЛИРУЮЩЕГО РАЗВИТИЕ ОТРАСЛИ

Не будем рассматривать правила и механизмы взаимодействия фарма-

цевтических компаний с регулирующими органами в части регистрации, вывода на рынок и организации сбыта готовых лекарственных средств – это вопрос взаимодействия Минпромторга с Минздравсоцразвития. Мы хотим сконцентрироваться на вопросах правового регулирования ранних стадий инновационной цепочки в области фармакологии. Если посмотреть на ситуацию «в общем», то покажется, что никаких проблем не существует. Имеет место существенное повышение финансирования академической науки, развитие профильных ведомственных и федеральных целевых программ (две программы биологического отделения РАН, ФЦП Роснауки), есть введение новой тематики в РФФИ, создание ряда государственных корпораций, венчурных фондов с государственным участием и РВК, запуск в Фонде Бортника программ «Старт», «Темп», «Пуск», внесение изменений в законодательство в части интеллектуальной собственности... И тем не менее, ситуация меняется крайне медленно. Особенно это касается направления фармакологии. Государство не готово реально передать бизнесу результаты работ, выполненных при государственном финансировании, не готово просто оказать содействие в развитии профильного высокотехнологичного бизнеса без диктата правил игры на всех стадиях. Государство попало в собственную ловушку в виде своей же административной реформы, когда все государственное управление вылилось в совокупность конкурирующих ведомственных программ с невообразимым числом критериев и регламентов проверки. Все это при-

вело к тому, что из-за отсутствия согласия между ведомствами в деталях реализации заявленной политики, более того, порой в понимании сути самой политики все необходимые для эффективной реализации этой политики документы – подзаконные акты, инструкции и т.д. – прописаны весьма неконкретно и противоречиво. Если же эту проблему не разрешить сейчас, то все дальнейшие шаги и программы по развитию инновационной составляющей фарминдустрии окажутся неэффективными. По-прежнему недостаточно налажено взаимодействие Минздравсоцразвития с остальными ведомствами и участниками фармрынка. Здесь если и есть какие-то предложения, то механизмы и инструменты их реализации серьезно не рассматриваются. Развитие фармацевтической промышленности по инновационному сценарию должно опираться на всю инновационную цепочку – от научных разработок до распространения полученных лекарственных средств. Поэтому без детальной проработки механизмов взаимодействия с Минобрнауки, другими ведомствами и профильными государственными институтами развития данная стратегия вряд ли будет полноценной. Сейчас идут весьма активные и достаточно эффективные переговоры между двумя ключевыми для развития отечественной фармацевтической промышленности (особенно на первом его этапе) ведомствами – Минпромторгом и Минздравсоцразвития. Первое министерство отвечает за данную отрасль как таковую, второе является определяющим игроком на фармацевтическом рынке, в частности:

а) регулирует правовые аспекты по большинству параметров процесса производства и распространения лекарственных средств; б) имеет подведомственные отраслевые организации – участники данного рынка; в) является одним из основных покупателей на рынке лекарственных средств. Долгое время политика Минздравсоцразвития не способствовала развитию отечественной фармацевтической промышленности. Если же здравые решения и принимались на высшем уровне, то далеко не всегда они завершались эффективной реализацией на уровне исполнителей. Возможность нашего бюрократического аппарата «замотать» вопрос и обеспечить сохранность удобной для себя модели были поистине фантастические. В нынешних условиях жесткой экономической ситуации такие игры, возможно, не пройдут. Тем более что сейчас, со сменой руководства Минздравсоцразвития, политика этого ведомства наконец стала меняться, и предложены достаточно конкретные шаги по стимулированию отечественного рынка лекарств. И есть основания полагать, что их выполнение обеспечит решение поставленной задачи.

### 3. ОТСУТВИЕ ОБЩЕНАЦИОНАЛЬНЫХ ПРИОРИТЕТОВ РАЗВИТИЯ МЕДИЦИНЫ И ФАРМАЦЕВТИКИ

Это одна из ключевых проблем, без решения которой развитие будет происходить «вслепую». Инвестиционные и технологические циклы в фарминдустрии довольно велики, и владельцы предприятий хотят быть уверены, что тот или иной препарат, на создание и вывод на рынок которого затрачена масса усилий, не окажется невостребованным. Разработка системы приоритетов, иначе говоря, утверждение тех главных областей медицины, для которых необходимы инновационные препараты, – это та задача, без которой эффективное и надежное развитие фарминдустрии невозможно или крайне затруднительно. Лежат ли эти приоритеты в сфере борьбы с онкологическими заболеваниями, кардиоваскулярными, инфекционными или иными – вопрос, на который можно и необходимо искать ответ именно сейчас

#### СПРАВКА

«Фарма–2020» (Стратегия развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2020 г.) разработана Министерством промышленности и торговли РФ в 2008 г. Стратегия призвана определять пути реализации приоритетных направлений развития фармпроизводства России, быть основой для государственно-частного партнерства по вопросам развития фармацевтической промышленности, обеспечивать согласованность действий органов государственной власти по направлениям развития отрасли, определять векторы разработки и корректировки нормативно-правовой базы фармацевтической промышленности и служить основой для принятия государственных решений по разработке и реализации целевых программ и проектов развития отрасли



с учетом российских реалий, мнений ученых и клиницистов. Выработка приоритетов, конечно же, не ограничивается списком групп заболеваний, борьбу с которыми необходимо вести в первую очередь. Столь же важно – особенно для высокотехнологичной биофармакологии – установление приоритетов в области создания многофункциональных методик и универсальных платформ для получения новых молекул, субстанций и препаратов, будь то разработка рекомбинантных белков или разработка методик адресной доставки лекарств в человеческом организме. Благодаря системе ДЛО и госзакупок Минздравсоцразвития в настоящее время выступает одним из основных покупателей на этом рынке. Это ведомство, по сути дела, влияет на большую часть этого рынка; без четкой политики Минздрава как игрока и покупателя в отечественной фарме ничего особенно не изменится. В этом сборнике мы намерены как можно более подробно осветить все перечисленные проблемы и дать возможность высказать свою точку зрения тем, кто уже участвует в создании современных препаратов, технологий и предприятий в биотехнологической и фармацевтической областях.

## **СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ОТРАСЛИ**

### **ЕСТЬ ЛИ У НАС ИННОВАЦИОННЫЕ РАЗРАБОТКИ?**

Некоторые эксперты утверждают, что у нас в стране фармацевтическая отрасль и научные исследования для нее в принципе никогда развиты не были. Приводится следующий довод: как правило, это было производство дженериков – якобы все молекулы, все исходные данные чуть ли не со времен пенициллина и ранних антибиотиков мы начали получать из-за рубежа, а дальше просто занимались воспроизводством. Более того, все это воспроизводство было размещено либо в союзных республиках, которые отошли от России, либо в странах Варшавского договора. На самом деле это не совсем так. Во-первых, в России осталось достаточно много фабрик. Да, они слабенькие, но вполне могут быть объектами

для развития будущего производства. Во-вторых, подобные высказывания больше касаются «химической» области фармы, т.е. создания молекул при помощи методов органической химии. В области же биотехнологий, как признают эксперты, оригинальных российских разработок было больше. И многие результаты исследований в этой области были вполне конкурентоспособны по сравнению с зарубежными. Эти успехи во многом объясняются тем, что данная область была связана с оборонными заказами, с разработкой биологического оружия и средств защиты от него. Еще остались крепкие биотехнологические коллективы, школы, навыки. Поэтому развивать такое инновационное направление, как биофармакология, у нас в стране возможно. Впрочем, «химические» и биотехнологические основы фармацевтики ни в коей мере не противоречат, а дополняют друг друга. Это как раз те два пути, по которым может развиваться отечественная фарминдустрия.

Так или иначе, можно утверждать: а) отечественная фармацевтическая промышленность в своем высокотехнологичном варианте все-таки уже существует; б) все инновации в этой сфере базируются на разработках российских ученых (как бы обе стороны – бизнес и наука – ни критиковали друг друга).

Вот несколько примеров таких разработок.

1) Группа компаний «Биопроцесс» выполняет совместно с ФГУП «ГосНИИгенетика» в рамках т.н. инновационного проекта (государство осуществляет софинансирование в размере до 1 млрд рублей) работы по созданию ряда важнейших биодженериков. В рамках проекта для последующего выведения на рынок разрабатываются: субстанция интерферона альфа-2b мирового уровня качества (она необходима для лечения таких заболеваний, как грипп, острые респираторные вирусные инфекции, вирусные гепатиты В и С, различные онкологические заболевания) и субстанция эритропозтина, а также ряд ферментов.

2) ОАО «Фармстандарт» активно продвигает на рынок отдельные препараты, созданные в Институте биоорганической химии им.

акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, например, «растан» (первый отечественный гормон роста), нейпомакс (филграстим) — гранулоцитарный колониестимулирующий филтрь.

3) Компания «Биокад» пошла по пути создания собственного научного центра. Причем сам центр создавался в подмосковных Любучанах на базе государственного НИИ, а его подразделение в Новосибирске — на базе НИИ генетики и молекулярной биологии. Понятно, что школа и научные кадры, которые использовал «Биокад», были в свое время созданы государством. Но частная компания, по сути, спасла закрывающийся НИИ и создала новую систему управления. Это реальный пример эффективной преемственности, возникшей, правда, «не благодаря, а вопреки». Почти во всех фармацевтических компаниях нам признавались, что регулярно заказывают российским ученым те или иные исследования. В институтах Российской академии наук сейчас сосредоточены наши лучшие силы в области биотехнологий и органической химии. Но взаимодействие фармпредприятий с ними в большинстве случаев оканчивается без особого успеха. Когда появились первые отечественные фармпроизводители, они обошли в поисках новых разработок, новых препаратов, имеющихся инноваций почти все сколько-нибудь стоящие коллективы. Результат оказался близок к нулю – фармпроизводителей интересовали почти готовые разработки, то, с чем можно выходить на рынок. А если не на рынок – хотя бы на клинические испытания. Таких препаратов, фактически инновационного продукта, у российских ученых не было. Почему? Как уже говорилось, финансирование академических институтов достаточно долго было очень слабым. Были гранты и прочее, но на серьезные исследования, по результатам которых могли быть созданы новые молекулы с выходом на доклинику, у нас практически не выделяли средства. Прецеденты можно пересчитать по пальцам. Нового оборудования (секвенсаторов и пр.) у российских ученых тоже не было. Было достаточно много теоретических исследований, много небольших, качественных

экспериментов, много идей, возможных направлений для исследований, но это все не было систематизировано. Однако те результаты, которыми гордятся, которые высоко ценят сами ученые (зачастую по праву), с точки зрения фармпроизводителей оказываются непригодны, не представляют интереса как продукт. А для того чтобы имеющиеся результаты можно было довести до прилавков аптек, нужно время. С учетом слабой технологической базы и недостатка навыков работы в условиях высокотехнологичного производства на создание нового лекарства времени уходит очень много. Заметим, что есть небольшой опыт успешного взаимодействия, совместных работ ученых и промышленников, но как надежно работающая система такие взаимоотношения не выстроены.

Повторим: основная идеология стратегии – активная поддержка инновационного пути развития отечественной фармотраслы, т.е. захват

существенной доли рынка инновационных препаратов российскими производителями наряду с развитием собственного производства большинства основных дженериковых препаратов. Поддержка и развитие российского дженерикового производства – задача с точки зрения технологии исполнения понятная и достаточно простая. Вопрос упирается в наличие политической воли и качество менеджмента, хоть с ними всегда были проблемы. Производство дженериков в нынешних условиях не является чем-то очень сложным, это понятное с точки зрения экономики, процессов, технологий направление фармотраслы. Оно, безусловно, будет конкурировать, причем тяжело конкурировать с Индией и Китаем, но вполне сможет вписаться в экономическую модель существования и его развивать. Более того, есть примеры, когда отдельные наши предприятия, занимающиеся производством тех или иных видов дженериков, имеют неплохие

экономические показатели. Да, безусловно, они не получают сверхприбыли, но все же лучше иметь 15 % рентабельности сначала на высокотехнологичных производствах, чем не иметь рентабельности вообще, либо иметь заводы с устаревшим оборудованием и малоквалифицированной рабочей силой.

Что касается биофармы, то здесь вполне возможен и необходим инновационный путь развития, потому что в стране немало научных коллективов, способных конкурировать по наработкам с зарубежными коллективами. Другое дело, что связи между существующим фармпроизводством, которое специализируется в этой области, и разработками, которые ведутся в научных коллективах, почти нет, а без связи между заказчиком и научными работниками область научных исследований просто чахнет. ●

# Биофарма: как преодолеть «долину смерти» между НИР и внедрением?

А.Л. Конов, А.А. Леонов

ООО «Управляющая компания "Биопроцесс Кэпитал Партнерс"»

Сегодня у российской биофарма очевидны две главные проблемы, считают Алексей Конов, директор по инвестициям, и Андрей Леонов, менеджер по инвестициям ООО «Управляющая компания "Биопроцесс Кэпитал Партнерс"».

Строчки поэта-сатирика Игоря Губермана про толпу естествоиспытателей, которая «на тайны жизни пялит взоры», были написаны более четверти века назад. Если рассматривать грустный финал четверостишия (о жизни, которая «шлет» этих естествоиспытателей по известному в народе адресу) как иллюстрацию процесса внедрения научных разработок в практику, то, надо признать, с тех пор ситуация вряд ли изменилась к лучшему, а скорее – к худшему.

Действительно, к моменту распада СССР (конец 80-х годов XX века) фармацевтическая и биофармацевтическая промышленности выполняли основные функции самообеспечения нации необходимыми для поддержания здоровья лекарствами. Биофармацевтика в СССР функционировала похожим на современную корпорацию образом. У каждой отдельной отрасли были свои профильные НИИ, в которых проводились научные разработки, нацеленные на конкретное производство. Также существовали центры общего пользования, которые решали общие научные задачи советской биофармацевтики. Централизованное планирование ОКР и внедрения позволяли по ряду направлений быть Советскому Союзу на уровне стран-лидеров...

## ДВЕ КЛЮЧЕВЫЕ ПРОБЛЕМЫ

Две ключевые проблемы сегодня – дефицит перспективных отечественных разработок и отсутствие внутреннего рынка для таких разработок.

**Проблема первая** – отсутствие готовых к регистрации и выходу на рынок инновационных разработок. Бурное развитие сегмента биофармацевтики в мире в 80-е – 90-е годы XX века совпало с периодом стагнации в отечественной науке и технологиях. Наше отставание в этой области особенно заметно: отсутствуют не только готовые к внедрению биофармацевтические продукты, но и высокопродуктивные технологии их производства. Прежде всего это касается препаратов, производимых клетками эукариот (ряд рекомбинантных белков, факторы свертывания крови, терапевтические моноклональные антитела). В результате доля биотехно-

логических субстанций отечественного производства, используемых в РФ для изготовления лекарств, критически мала – всего 2 %. Для сравнения: доля высокотехнологичных химических субстанций отечественного производства в выпускаемых у нас готовых лекарственных форм все же выше – 15 % и 5 %, в количественном и денежном выражении, соответственно. Образующийся дефицит закрывается импортом субстанций. При этом основные страны, из которых происходят поставки на российский рынок, – Китай и Индия, а основными поставщиками наиболее дорогих инновационных биотехнологических препаратов выступают крупные западные производители. Тем временем за рубежом разработки новых производственных штаммов и промышленных технологий ведутся очень интенсивно: сегодня

они существенно превышают уровень продуктивности отечественных пятнадцатилетней давности. Как создать портфель инновационных разработок? Очевидно, что существует две возможности:

– попытаться наладить поток разработок от НИР через ОКР и до производства собственными силами;

– импортировать на выгодных условиях появившиеся «в свободном доступе» западные разработки, которые уже готовы к регистрации и постановке в производство.

**Проблема вторая** – отсутствие современных производителей, готовых акцептовать передовые разработки. Стандартная схема инновационного процесса – от НИР через испытания и производство к внедрению, даже будучи оптимизирована в соответствии с отечественными реалиями, вряд ли сможет быть реализова-



Конов Алексей Львович, директор по инвестициям ООО «Управляющая компания "Биопроцесс Кэпитал Партнерс"»

на в отсутствие внутреннего рынка на результаты венчурной деятельности: создав и реализовав механизмы инкубирования продуктовых проектов, мы все равно упрямся в проблему покупателя (акцептора) таких проектов. В России отсутствует сколько-нибудь заметный рынок в области современной биотехнологии, т.е. нет крупных игроков, которые выступали бы основными потребителями новых технологий, вырастающих на базе посевных инвестиций. По уровню биотехнологической промышленности Россия сегодня сильно уступает большинству ведущих стран мира, ее доля в мировом биотехнологическом производстве составляет менее 0.3 %, при этом доля биофармацевтики близка к нулю.

Получается, что решать две проблемы надо комплексно – необходимо создавать портфель продуктовых проектов и строить систему акцептирования продуктов.

В данной статье мы не будем рассматривать актуальную сегодня проблему импорта разработок в Россию, мы также не будем затрагивать важнейшую проблему создания «акцептора» таких разработок. Мы оста-

новимся на вопросе о возможности в «домашних условиях» сделать инновационный продукт, готовый к внедрению. Ниже мы попробуем показать, что ни один из существующих сегодня институтов развития и венчурного (проектного) финансирования не приспособлен в полной мере для работы на ранних (посевных) стадиях, когда требуется «выращивание» разработок практически с нуля.

### СОБСТВЕННЫЕ РАЗРАБОТКИ: ОТ ЗАМЫСЛА ДО ВНЕДРЕНИЯ

Как сказано в недавно утвержденной стратегии «Фарма-2020» ([www.pharma2020.ru](http://www.pharma2020.ru)), «в сложившейся ситуации российская фармацевтическая индустрия не сможет выжить, будучи зажата между западными транснациональными корпорациями, диктующими правила игры в сфере технологий и интеллектуальной собственности, и производителями из Индии и Китая с их беспрецедентным ценовым давлением. Ни зарождающиеся отечественные компании – разработчики лекарств, ни создаваемые венчурные фонды пока не готовы финансировать долгосрочные и рискованные по своей природе разработки инновационных фармацевтических препаратов».

В развитии и внедрении высоких технологий есть две «долины смерти». Первая – от замысла, идеи, первых успешных экспериментов – до работающей модели. И вторая – от только-только начинающего расти бизнеса до стадии бурно растущей компании. В мире вторую «долину» закрывает венчур, а первую – посевные фонды, ангелы-инвесторы. Ангелами на развитых рынках обычно выступают так называемые «три F»: *fools, family, friends* – переводя с английского: дураки, родственники и друзья. Эффективно «закрывать» обе «долины смерти» в России – непростая задача, которую предстоит решать.

Рассмотрим стандартные алгоритмы коммерциализации исследований по фарме/биофарме, сложившиеся на Западе, и попробуем указать на российские «белые пятна» этого процесса (схема на *рис. 1*).

В государственных лабораториях ведутся исследовательские работы, которые иногда приносят многооб-

ещающие результаты в плане создания новых лекарств и технологий. Однако между созданным прототипом лекарства или лабораторной технологией и лекарством на рынке или промышленной технологией лежит так называемый «регуляторный процесс», который дорог, долгов и изобилует рисками. На *рис. 2* (*стр. 14*) показана схема прохождения этого пути: на ранних стадиях риски «схода с дистанции» чрезвычайно высоки, высоки и затраты, однако последние несравнимо ниже последующих затрат на испытания.

Полученное в ходе проведения этапов НИОКР активное вещество (молекула) перед испытаниями на людях должно быть протестировано на модельных животных. На стадии доклинических исследований определяется токсичность новой молекулы, моделируется эффект, устанавливаются фармакокинетические и фармакодинамические параметры. Регуляторные органы анализируют собранную по разрабатываемому препарату информацию, полученную в ходе доклинических испытаний, и принимают решение о допуске его в клинические испытания на людях.

Клинические испытания лекарственных средств перед их официальным разрешением к медицинскому применению проводятся в три этапа, традиционно называемые «фазы клинического испытания».

Первая фаза клинических испытаний (фаза I) – клинико-фармакологические и биомедицинские испытания проводятся на небольшой группе (обычно 36) здоровых добровольцев. При этом изучают переносимость однократной дозы препарата, фармакокинетические параметры и фармакодинамические эффекты. Важность проведения клинических испытаний первой фазы состоит в получении данных о переносимости и безопасности препарата с целью принять решение о его дальнейшей разработке или прекращении исследований. Начальную дозу, кратность и путь введения препарата обычно устанавливают в доклинических испытаниях (на лабораторных животных). Однако из-за различий в фармакокинетике и фармакодинамике у человека и у животных такие дозы могут требовать коррекции.

Если препарат оказался безопасным и хорошо переносимым, клиническое испытание переходит во вторую фазу клинических испытаний (фаза II). Эта фаза требует включения большего количества испытуемых, обычно 100–150 пациентов, но с заболеванием (или состоянием), для лечения, диагностики и/или профилактики которого и предназначен активный ингредиент. Цель фазы II – доказательство клинической эффективности лекарственного средства у определенной группы пациентов (оценка краткосрочной безопасности,

определение уровня терапевтической дозы, отработка схемы дозирования). Испытания фазы II являются наиболее важным этапом, необходимым для принятия решения о продолжении разработки нового лекарственного препарата.

Если препарат оказался эффективным и безопасен во второй фазе, он исследуется в третьей (фазе III). Клинические испытания третьей фазы представляют собой тщательно контролируемые исследования, спланированные для определения безопасности и эффективности ле-

карственного средства в условиях, приближенных к тем, в которых оно будет использовано в случае его разрешения к медицинскому применению. Цель – определение долгосрочного отношения безопасности/эффективности для лекарственных форм активного компонента. Обычно исследования имеют сравнительный характер по отношению к существующей стандартной терапии (или плацебо при исследовании нового класса препаратов).

Инновационные продукты регистрируются после проведения

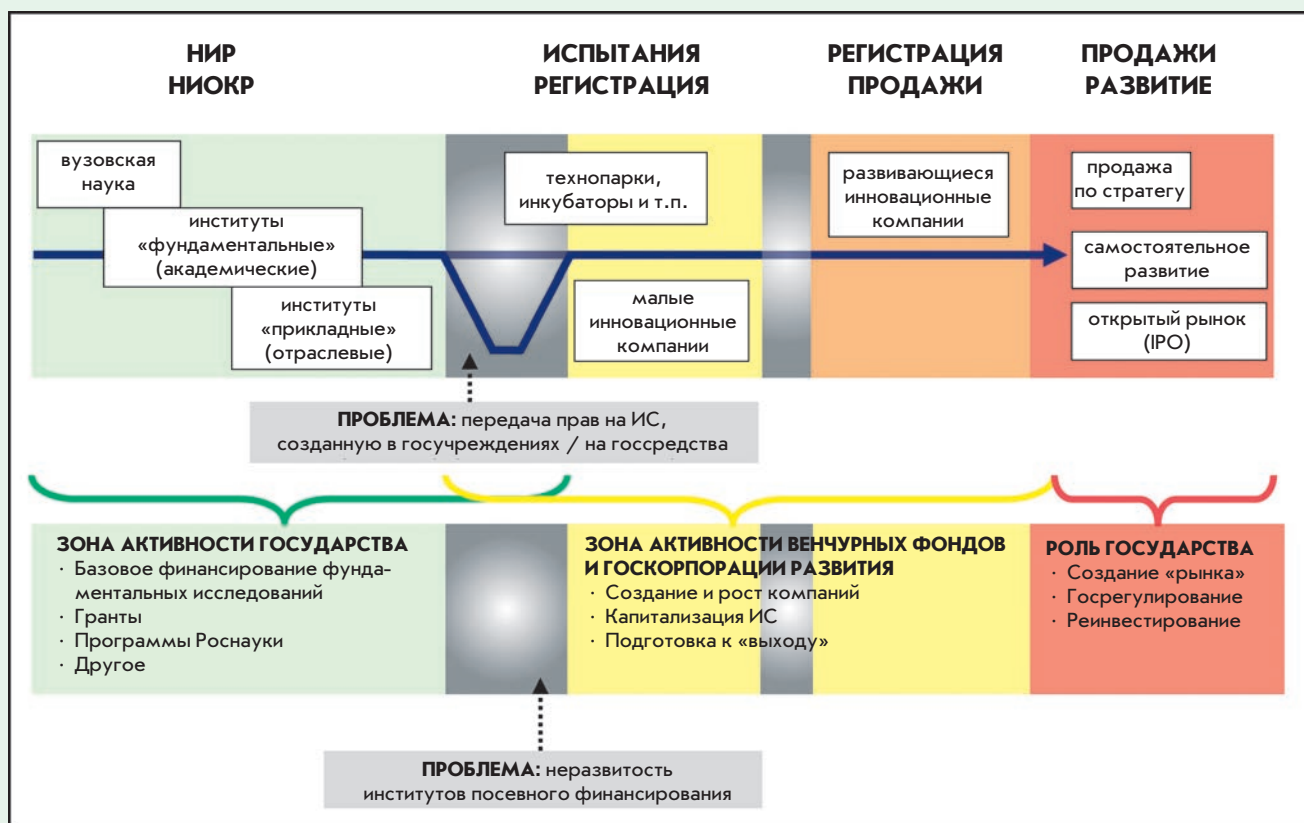


Рис. 1. Стандартная схема инновационного процесса.

Цветовая схема иллюстрирует «созревание» проектов от стадий зарождения («зеленые») до стадии зрелости («красные»). В области фармы (и биофармы в частности) путь разработки пролегает от НИР (НИОКР) через испытания и регистрацию к выходу на рынок (синяя линия на рисунке). Если разработка зарождается в государственном учреждении (вуз, НИИ), то первая проблема на пути будущей коммерциализации – как передать права на созданную в стенах госучреждения интеллектуальную собственность в частную компанию. Так долго ожидавшиеся и только что принятые изменения законодательства (см. ФЗ №217 от 2 августа 2009 г.) призваны эту проблему решить, тем не менее следует подождать, что покажет практика реализации нового закона. Вторая проблема, на наш взгляд, более серьезная и заключается в финансировании компаний ранних стадий. Несовершенство законодательства и неразвитость институтов посевного финансирования приводят к значительному провалу (серая зона на рисунке): большая часть потенциальных проектов «падает» в финансовую яму, и лишь небольшая часть проходит «напрямую» из «зеленой» зоны в «желтую», где уже работают венчурные механизмы финансирования (поэтому «серый провал» там уже не так заметен)

третьей фазы клинических исследований. Количество пациентов в исследовании последней фазы может составлять уже тысячу человек в зависимости от конкретного препарата и заболевания. Таким образом, каждая последующая стадия становится все более дорогостоящей для разработчика лекарственного средства.

Очевидно, что государственным учреждениям самостоятельный вывод лекарства на рынок не под силу. Потенциальные продукты, созданные на Западе в государственных, в основном в университетских, лабораториях, выставляются «на продажу». Многие продукты и технологии, которые, как правило, находятся на стадии идеи, покупаются фармацевтическими компаниями путем лицензирования. Чаще же всего для разработок ранних стадий характерно развитие в форме «партнерства» с отложенным опционом для большой компании на получение продукта при успехе всего цикла работ.

Если команда разработчиков, трудящихся в государственных науч-

ных учреждениях, видит серьезный коммерческий потенциал созданного ими продукта или технологии и верит в свои собственные силы начать собственное дело, то создается стартап. Условия, на которых это происходит, всем понятны – все права на продукт или технологию передаются в компанию, а учреждение, в котором работала или продолжает работать команда разработчиков (основателей компании), имеет в ней долю. Далее пишется бизнес-план, цель которого – привлечение внешнего финансирования и продолжение исследований с намерением довести продукт до рынка с перспективой максимальной выгодной продажи. После этого основатели компании обходят все доступные финансовые институты, которые осуществляют венчурное инвестиционное финансирование. Для получения инвестиций им приходится убеждать, уговаривать, описывать «мечту». История большинства стартапов заканчивается на этой стадии, но некоторым везет. В этом случае они получают

начальное финансирование в обмен на пакеты акций своей компании. Деньги расходуются на исследования, и по мере получения положительных результатов стартап все увереннее может себя чувствовать и привлекать следующие инвестиции. Чаще всего исследования затягиваются, результаты получаются неутешительными, фонды перестают инвестировать, и история стартапа завершается. Реальная ситуация такова, что остаются единицы. Эти компании-«счастливчики» создают продукт, стоимость которого огромна по сравнению с вложенными средствами, и все акционеры получают свою прибыль.

В России необходимо создавать условия как для первого пути (прямое лицензирование от государственных учреждений фармацевтическим компаниям), так и – главное! – для создания небольших инновационных стартапов «под идею».

Перечислим основные проблемы, которые, на наш взгляд, стоят сегодня на пути эффективного становле-

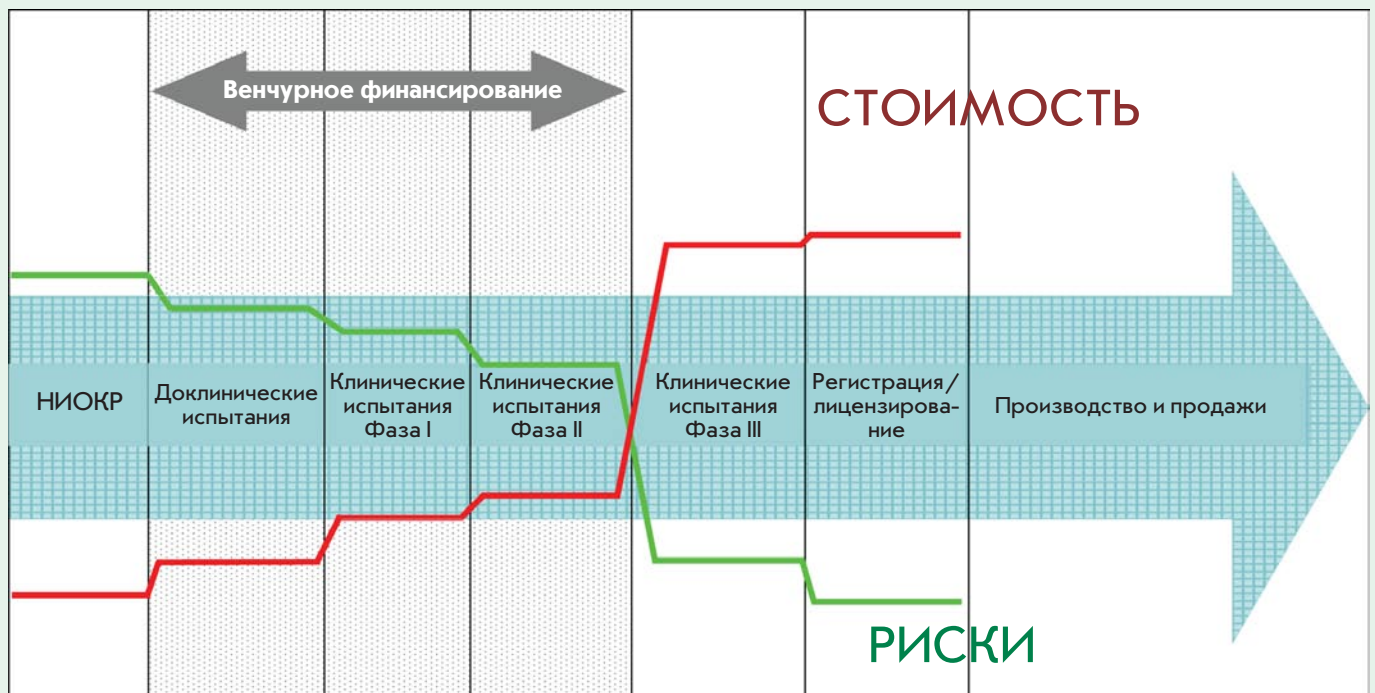


Рис. 2. Развитие нового лекарства: от разработки до рынка. Венчурное финансирование обычно привлекают на этапе после успешного завершения НИОКР. Фонды выходят из проектов до начала клинических испытаний фазы III, а зачастую намного раньше – после фазы II и даже фазы I клинических испытаний. Описание этапов см. в тексте. – Ред.

ния малых инновационных компаний в области фармацевтики и биофармацевтики в частности.

**Проблемы «организационные»: как создать компанию, как легально и эффективно вести лабораторные работы?**

В России нет культуры создания малых компаний учеными. Им не понятно, «куда идти», какие бумаги собирать и т.п. Отсутствуют специализированные технопарки, инкубаторы, которые готовы предоставить не только юридическую и организационную, но и лабораторную и логистическую инфраструктуру. Ведь в нашем случае речь идет о компании, проводящей исследования в лаборатории. А значит, к стандартным проблемам малой компании добавляются проблемы получения разрешений на работу с химическими реактивами, биологическими объектами, радиоактивными изотопами и т.д. Сегодня это решается арендой

площадей в институте, где ранее велись работы. Часто арендуется «для формы» несколько квадратных метров, а продолжают использоваться те же площади и то же оборудование. Но это возможно только тогда, когда заведующий лабораторией (директор института, декан факультета) «благоволит новому детищу». В противном случае люди работают полуполюгально или вообще «в черную».

**Как передать интеллектуальный задел по проекту в новую компанию?**

Если патент еще не оформлен, т.е. интеллектуальная собственность представляет собой ноу-хау, то встает вопрос – на кого оформлять заявку как на владельца? Если владелец – государственное учреждение, а ученый только автор, то максимум, на что человек может претендовать, – на авторские роялти при последующей коммерциализации продукта. Но ни одно государственное

учреждение не способно сегодня довести продукт до рынка, поскольку не имеет ни финансов, ни полномочий, ни мотивации.

Оформить на себя или на новую компанию тогда, когда она еще не создана? Но до недавних пор это было незаконно – ведь все работы велись в рабочее время, на рабочем оборудовании и на государственные деньги. Таким образом, ключевая задача – решить вопрос с интеллектуальной собственностью, с правами разработчиков на результаты, с возможностью легального «отделения» от материнской организации и создания малого предприятия (отдельно или в рамках технопарка).

Сегодня это становится возможным благодаря принятию очень важных поправок в законодательство. Согласно Федеральному закону № 217 бюджетные научные и образовательные учреждения и созданные государственными академиями наук

**СОЗДАНИЕ ИННОВАЦИОННЫХ ЛЕКАРСТВ ВНУТРИ ИНДУСТРИАЛЬНЫХ КОМПАНИЙ**

В схеме на рис. 1 (стр. 13) не показан путь развития продукта, созданного внутри индустриальной компании. Крупные транснациональные корпорации имеют собственные подразделения для проведения НИОКР, ведущие работы широким фронтом, однако КПД их деятельности (соотношение затраты/количество и качество разработанных новых лекарств) существенно ниже, чем КПД малой инновационной компании, обычно нацеленной на создание одного конкретного лекарства или технологии.

Можно ли сегодня уповать на создание инновационного продукта внутри отечественной индустрии? Вряд ли. Существующие на рынке компании (вне зависимости от формы собственности) до недавних пор не были готовы вкладываться в высокорисковые инновационные лекарства. Чаще всего российские проекты в области биофармы реализуются в ключе стратегии «А что там сделали на Западе? Давайте быстро повторим!». Причем важно отметить, стратегия эта совсем не дурна – она работает, и работает неплохо.

Один из бизнесов, который мы запустили в «Био-процессе», – производство основных биодженериков: интерферона альфа, эритропоэтина и гранулоцит-колониестимулирующего фактора – был построен именно по такой модели. Но только спустя 5–6 лет, когда он стал приносить доход, появилась возможность развивать на его базе действительно новые продукты.

По такой же модели строились производства в Индии и Китае, по крайней мере в области биофармы. При этом в обеих странах индустрия получала мощную государствен-

ную поддержку (прямое финансирование, налоговые каникулы, преференции в регистрации и закупках и пр.). Сегодня индусы и китайцы начинают побеждать развитые страны на «их поле» – в сфере инновационных продуктов. И нам в России важно не упустить время. Однако нашим даже самым успешным компаниям не под силу, из-за своих масштабов, вложить десятки млн долларов в развитие и регистрацию действительно инновационных лекарств без помощи государства.

До недавних пор существовало два основных механизма получения государственного софинансирования инновационной фармразработки: программы Роснауки и программы Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере. Программы Фонда «заточены» под малые компании, для работы с индустрией они не подходят. Программы же Роснауки, к сожалению, не подходят индустрии по своей сути: максимальный срок программ – три года, по истечении этого срока требуется удовлетворить т.н. «индикаторы программы», заключающиеся в том, чтобы объемы реализации созданной инновационной продукции превышали в то или иное число раз объемы вложенных средств. Таким образом, даже если в программу входит разработка уже на стадии первой фазы клинических испытаний, то за три года невозможно не только обеспечить выпуск и продажи, но и вывести продукт из регистрационного процесса на рынок.

Сегодня созданы сходные программы в Минпромторге России, там удалось раздвинуть сроки программ до четырех лет, и пока единственным индикатором является начало промышленного производства. Это уже более реальные условия для бизнеса.



Леонов Андрей Александрович, менеджер по инвестициям ООО «Управляющая компания "Биопроцесс Кэпитал Партнерс"»

научные учреждения и вузы «имеют право без согласия собственника их имущества с уведомлением федерального органа исполнительной власти, осуществляющего функции по выработке государственной политики и нормативно-правовому регулированию в сфере научной и научно-технической деятельности, быть учредителями (в т. ч. совместно с другими лицами) хозяйственных обществ, деятельность которых заключается в практическом применении (внедрении) результатов интеллектуальной деятельности».

Что касается проведения «казных» работ в государственных учреждениях с целью их последующей передачи в промышленность – это схема, уже доказавшая свою неэффективность. Без прямой материальной заинтересованности разработчиков не только в сдаче работы, но и в выводе продукта на рынок и росте компании ничего сделать не получится.

#### КАК ПОЛУЧИТЬ ФИНАНСИРОВАНИЕ!

На сегодняшний день практически единственной формой поддержки только что созданного стартапа в России являются программы Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (Фонд Бортника). За прошед-

шие годы Фондом созданы работающие механизмы коммерциализации научных разработок – средства программ «Старт», «Пуск», «Университеты», «Молодежный бизнес» и др. направляются на проекты ранних стадий НИОКР. При этом в разные годы на проекты в области биотехнологий и медицины выделялось до 20 % средств программ Фонда. Примечательно, что одной из задач Фонда на ближайшее будущее является развитие взаимодействия с венчурными и другими структурами, участвующими в финансировании проектов по всему инновационному циклу.

Правительство Москвы для помощи компаниям, учрежденным в столице, создало некоммерческое Агентство по развитию инновационного предпринимательства, которое реализует несколько интересных программ, в частности:

- выделение малым инновационным предприятиям субсидий на изготовление опытного образца или мелкой серии (это очень важный этап для демонстрации proof of principle – именно то, что необходимо показать венчурному инвестору для получения денег венчурного фонда);

- выделение субсидий на патентование результатов инновационной деятельности как в России, так и за рубежом.

Наконец, следует упомянуть про программы Роснауки для поддержки разработок ранних стадий. Вклад этих программ в поддержку ряда ведущих отечественных лабораторий институтов РАН трудно переоценить, однако следует помнить, что данные программы нацелены прежде всего на финансирование прикладных работ. Возможно, именно поэтому их эффективность пока далека от желаемой: академические лаборатории и по статусу, и по менталитету, и по мотивации плохо приспособлены для создания и выведения на рынок конкретного продукта в сжатые сроки.

#### КАК И ГДЕ ПРОВЕСТИ ИСПЫТАНИЯ!

Компания создана, НИР завершены, настал этап испытаний (доклинических и клинических) – как и где их провести, чтобы результаты соответствовали мировым требованиям

и не «убили» продукт для западных рынков? Мы уверены, что малая инновационная компания сегодня сама в состоянии провести весь цикл испытаний. Для этого нужен хорошо продуманный план, чтобы под него привлечь венчурное финансирование, профессиональный специалист по доклиническим и клиническим испытаниям и надежные партнеры – контрактные организации, специализирующиеся на таких исследованиях.

Проектный менеджмент и маркетинг – две составляющие ядра успешной фармацевтической компании завтра, они на 100 % должны осуществляться внутренними силами компании. Все другие процессы стоит передать на аутсорсинг. Субподрядчиками может выступить широкий круг контрактных сервисных организаций, сокращенно именуемый CSO (*Contract Service Organizations*). К ним относят прежде всего CRO (*Contract Research Organizations*), осуществляющие сервис по проведению части доклинических и клинических исследований; и CMO (*Contract Manufacturing Organizations*), осуществляющие сервис по отработке процесса производства и производство активных фармацевтических субстанций и готовых лекарственных форм для испытаний и, впоследствии, для рынка. Уже сегодня в мире малыми инновационными компаниями тратится до 50 % всего бюджета, заложенного на исследование и разработки, на оплату услуг CSO.

#### КОГДА И ЧЕМ ЗАКАНЧИВАЕТСЯ ЖИЗНЬ СТАРТАПА

Компания провела всю серию испытаний, получены хорошие данные по доклинике и клинике I фазы. Что делать дальше? Привлекать следующие деньги, уже очень большие, под испытания II/III фазы, искать партнера или продавать бизнес?

Однозначный ответ на этот вопрос дать сложно – все зависит от типа лекарства/нозологрии и текущей ситуации в компании и на рынке. Попробуем сделать несколько замечаний общего характера.

- Если в 70–80-е годы крупнейшие мировые компании выводили на рынок пять-семь новых молекул ежегодно, то сегодня – максимум две-три полностью оригинальных



молекулы в несколько лет. Чтобы окупить все затраты как на лидирующую разработку, так и на разработку, сошедшие с дистанции ранее, новая молекула должна продаваться на сотни млн долларов в год. В последние 20 лет индустрия подпитывалась главным образом хитами биотехнологической природы. Однако основные мировые биоблокбастеры, выведенные на рынок 15-20 лет назад, выходят из-под патентной защиты, и индустрии остро необходимы новые продукты-хиты.

- Сложность вновь выводимых на рынок соединений, появление новых знаний о механизмах действия и накопление статистики по возникающим побочным эффектам привели к смещению основного груза затрат из сегмента НИОКР в сегмент испытаний. Ведущие мировые регулирующие агентства (ЕМЕА и FDA) предъявляют все более сложные требования к испытаниям новых лекарств. В результате затраты на вывод одной новой молекулы на рынок увеличились в 3-5 раз и составляют сегодня 300-900 млн долларов совокупных затрат, это создает непреодолимый барьер для малых компаний в их стремлении повторить успех 25-летней давности венчурных стартапов *Genentech* и *Amgen*.

- Однако у малых инновационных компаний остается шанс привлечь венчурное финансирование на начальные этапы и развить новую разработку до первых стадий испытаний (завершение доклинических исследований или первой фазы клиники), после чего либо вступить в долгосрочную кооперацию с крупным игроком, привлекая его в качестве инвестора следующей стадии, либо «на корню» продать разработку (компанию) такому инвестору.

- Наступление рецессии в мировой экономике и дефицит ликвидности у крупных игроков – потенциальных стратегов выявили тенденцию к продолжению финансирования новых разработок до более поздних стадий за счет привлечения следующих раундов венчурного финансирования. Так, в сентябре-октябре 2008 года были зафиксированы крупнейшие раунды венчурного финансирования поздних стадий пяти компаний разработчиков, среди которых три компании – биотехнологические. Так, компания *Proteolix* привлекла 79 млн долларов от венчурных инвесторов для проведения II фазы клинических исследований биофармацевтического препарата против аутоиммунных заболеваний и рака, компания *MacroGenics* – 25 млн долларов для проведения II/III фазы испытаний оригинального моноклонального антитела против диабета, а компания *Link Medicine* – 40 млн долларов для неназванной поздней фазы развития биофармацевтического препарата против аутоиммунных заболеваний.

Таким образом, в ближайшие три-четыре года ситуация на рынке будет складываться очень благоприятно для малых венчурных компаний – разработчиков конкретных продуктов: пережившие тяжелые времена компании-гиганты продолжат активно скупать новые продукты (компания) для обновления своих продуктовых портфелей. С другой стороны, сегодня открывается уникальная возможность, проведя дополнительные раунды венчурного инвестирования, дорастить компанию до этапа выхода продукта на рынок, либо до продажи компании стратегу на существенно более поздних стадиях и за существенно большую сумму.

Что касается выхода на IPO, то в докризисный период некоторые

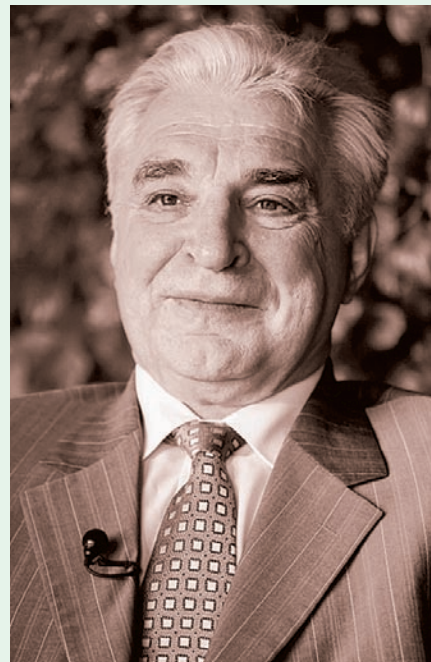
биотехнологические стартапы успешно становились публичными, однако это были скорее исключения из правил, поскольку продажа стратегическому инвестору в лице профильной корпорации была наиболее привлекательной перспективой для венчурной биотехнологической компании. Сегодня окно IPO практически закрыто, и ситуацию в ближайшие три-четыре года предсказать сложно.

## ВЫВОДЫ И РЕКОМЕНДАЦИИ

Чтобы поставить на поток процесс создания инноваций в области биофармы, необходимо, с одной стороны, решить организационные, законодательные и регуляторные проблемы, которые мы кратко затронули в статье. С другой стороны, этот процесс вряд ли будет эффективным без создания внутреннего рынка на результаты деятельности малых компаний: у нас нет своих фармгигантов, таких как *Bayer* или *AstraZeneca*, способных купить готовую разработку за 100 или больше млн долларов. В этой ситуации малые инновационные компании вынужденно отдадут разработку на Запад. Государство должно озаботиться созданием такой системы, при которой как минимум права на российский рынок могли остаться в России. Как это сделать – вопрос для отдельного рассмотрения, скажем только, что одним из механизмов могло бы стать объединение ряда малых инновационных бизнесов в «виртуальную» крупную компанию, где капитализировались бы не здания, цеха, оборудование (т.е. основные средства), а права на разрабатываемую интеллектуальную собственность. Такая «дезинтегрированная» компания, отдающая на аутсорсинг все основные этапы, кроме собственно разработки (НИОКР) и маркетинга, была бы фактически проектным офисом, гибким и быстро реагирующим на запросы рынка. ●

# Рецепт для российского инсулина

Долю отечественного инсулина на рынке, который в 2008 году оценивался в более чем семь миллиардов рублей, можно рассматривать под лупой: наши производители не набирают и 2 % (см. табл. 1). Незаслуженно мало, если учесть, что а) российские производители могут обеспечивать страну инсулином, по качеству сопоставимым с зарубежными аналогами или превосходящим их; б) сотни тысяч инсулинозависимых пациентов по причинам экономического или политического характера могут остаться без жизненно важного препарата. ВОЗ, кстати, рекомендует стране с более 50-миллионным населением иметь собственное производство инсулина. Анатолий Мирошников, заместитель директора Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН – института, в котором производят инсулин под маркой «Инсуран», – рассказывает журналу Acta Naturae о том, почему России нужны свои генно-инженерные заводы.



Мирошников Анатолий Иванович, академик, заместитель директора Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, председатель президиума Пушкинского научного центра, вице-президент Общероссийской общественной организации «Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова»

## ИСТОРИЯ БОЛЕЗНИ

**Анатолий Иванович, доля «Инсурана» на рынке инсулинов – 1,04 %. Это наш предел?**

– Нет, мы можем обеспечивать инсулином Российскую Федерацию на 100 %. Но вначале позвольте небольшую предысторию. В 1978 году, когда в мировой фарминдустрии началась эра биотехнологических производств, наш институт тоже достаточно успешно стал работать в этом направлении. К 1990 году, спустя всего три года после запуска производств генно-инженерного инсулина в Соединенных Штатах и Дании, мы получили штамм-продуцент и начали полупроизводственные исследования на Степногорском биохимическом комбинате в Казахстане. Отставание от Запада тогда было минимальным. Но после 1991 года все «умерло». Наука и химическая промышленность в России оказались на грани выживания, а фармрынок, в том числе и рынок инсулина, начали делить

западные производители. Только в 2000 году мэр Москвы **Юрий Лужков** издал распоряжение о создании на базе ИБХ РАН опытного производства генно-инженерного инсулина, мы получили в кредит 120 миллионов рублей и уже через три года начали поставлять инсулин в короткой и длинной формах в клиники Москвы. По распоряжению Лужкова мы должны были производить 300 тысяч флаконов в год. Однако в таком количестве закупать у нас инсулин столица отказалась – сослались на то, что от флаконной формы Москва потихоньку отказывается. Увы, но денег на картриджную линию нам никто не дал. Сейчас мы поставляем 95 тысяч флаконов в год и обеспечиваем 15 % московских диабетиков.

**Были ли за это время какие-то рекламации на «Инсуран»?**

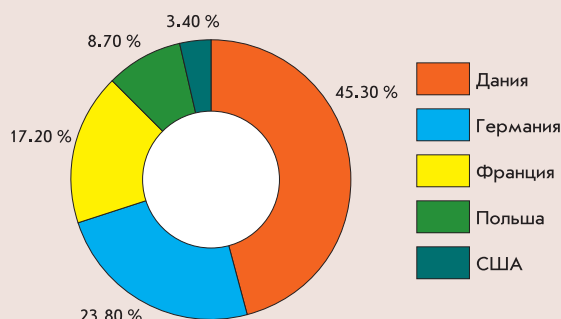
– За те пять лет, что мы поставляем инсулин в столицу, – ни одной. Производится он по стандарту GMP, и контролируется каждая партия

в 100 флаконов. Качество нашего инсулина может подтвердить главный эндокринолог Москвы **Михаил Борисович Анциферов**, да и врачи признают, что никакой разницы между западным (Elly Lilly, Novo Nordisk) и нашим инсулином нет. При этом «Инсуран» дешевле. Однако расширить производство до серийного нам не удастся – лекарственные потоки в клиники и аптеки давно сформированы, и никто не хочет пускать на рынок новых игроков. Играют роль устоявшиеся связи, с крепкими корнями, возможно, традицией откатов... В итоге 90 % отечественного рынка генно-инженерного инсулина чело-

«Наш препарат не только дешевле, но и лучше. При производстве «Инсурана» мы ушли от использования токсина бромциана, Elli Lilly продолжает его применять. Novo Nordisk использует дрожжевой штамм, который менее эффективен, сейчас они тоже переходят на бактерии. Но все это вовсе не означает, что нам будет открыта «зеленая улица». Уверен, что с продвижением на рынке возникнет немало трудностей. Западные компании без боя такой рынок сбыта, как Россия, не отдадут. И врачам будут соответственно внушать, что качество нашего инсулина хуже. То есть вступят в силу законы конкурентной рыночной борьбы».

Из интервью Анатолия Мирошникова, 2000 год  
(«Медицинский вестник», №4)

TOP5 стран происхождения инсулинов и их аналогов, поставленных в Россию, 1 кв. 2008 г.



ЦМИ «Фармэксперт»

века принадлежит американским и датским производителям.

Впрочем, мы тоже не сдаемся – на протяжении последних четырех лет я бьюсь за строительство серийного завода в Пущино. Казалось бы, вопрос почти решился – постановлением Правительства Московской области по инициативе РАН и ИБХ было организовано АО «Биоран», которое должно вести проект создания промышленного производства генно-инженерных препаратов медицинского назначения; нам даже выделили площадку для строительства и провели коммуникации. Но, к сожалению, грянул кризис, и «Биоран» не получил кредит. Если бы государство обеспечило гарантии возврата, деньги бы были. Завод должен был вступить в строй через 4.5 года и через 8 лет окупиться.

**При каком объеме госзакупок?**

– Завод полного цикла должен был производить 400 килограммов субстанции. Этого хватило бы на Россию, страны СНГ и даже на экспорт в арабские страны и Юго-Восточную Азию.

**Правильно ли я понимаю, что ваша технология производства инсулина ни в чем не уступает зарубежным?**

– Могу твердо сказать – наша технология даже лучше.

**ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

**Значит, вопрос лежит в области экономики и политики?**

– Абсолютно точно. И мы пытаемся это объяснить исполнительной

власти. В письме **Игорю Сечину** я говорил, что если мы хотим возродить фармацевтическую промышленность, нам нужно построить, по крайней мере, два завода. Один – по химии и фармацевтике, другой – по генно-инженерным препаратам (в мире их около 40).

Для генно-инженерного производства я вижу только одну площадку – Пущино, где есть условия

для развития биофармацевтической промышленности: семь профильных институтов по физико-химической биологии, два университета, экспериментальная база с международным сертификатом. Там можно было бы производить и инсулин, и интерферон, и факторы крови, и многие другие препараты.

Ведь когда-то наши химико-фармацевтические заводы были до-

Таблица 1

Фирма-производитель	2008 г., руб.	2008 г., руб. %
Novo Nordisk	3 402 384 126	47.39
Sanofi-Aventis	1 720 706 535	23.97
Elli Lilly	1 760 622 611	24.52
MARVEL LIFESCIENCES PVT.Ltd	129 616 186	1.81
Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН	74 424 660	1.04
BIOTON S.A.	25 986 679	0.36
Фармстандарт ООО	26 651 492	0.37
TONGHUA DONGBAO PHARMACEUTICAL CO.Ltd	2 695 064	0.04
Другие	27 136 365	0.38
M.J.BIOPHARM	9 081 318	0.13
«Национальные биотехнологии» ОАО	40 667	0.00
«Брынцалов-А» ЗАО	30 979	0.00
Общий	7 179 376 682	

стойны того, чтобы занимать в мировом рейтинге пятое место после США, Германии, Японии и Франции. А сегодня мы завозим 85 % лекарственных препаратов и где-то 12 % фасуем из иностранной субстанции. При этом большинство клинических испытаний западных препаратов проходит в России. Да, может быть, в 1990-х годах, когда, например, онкоцентры таким образом получали доступ к современным препаратам, это было оправданно. Но почему нас используют только как полигон для испытаний? Ведь не факт, что препараты, проходящие клинические испытания, их пройдут. А эксперименты-таки проводятся на людях.

**Итак, что нужно сделать для того, чтобы мы не зависели от импортного инсулина?**

– *Во-первых*, правительство должно принять решение о строительстве по крайней мере двух заводов и поручить его реализацию госкорпорации, например «Роснано» или «Ростехнологиям». Надеяться на то, что частный капитал вложится в строительство завода, бессмысленно. А вот после запуска завод можно продать российской частной компании. Такой завод может построить «Биоран», причем мое глубокое убеждение: 50 % плюс одну акцию «Биоран» должен отдать государству или госкорпорации.

– *Во-вторых*, я считаю, что мы должны говорить не столько о развитии фармацевтической промышленности, сколько о связанном с этим

**СПРАВКА:**

**Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН** имеет готовые к внедрению разработки альбумина человека, некоторых факторов крови и ферментов, на основе которых можно создавать противовирусные и противоопухолевые препараты. Также учеными института разработан новый аналог инсулина, оказывающий более быстрое и пролонгированное действие. Из вышедших на рынок технологий – первый отечественный инсулин и гормон роста.

развитием импортозамещения. Если бы РАМН сообщила фармацевтам, биотехнологам список из 2000 препаратов, жизненно необходимых для лечения онкологии, кардиологии, пульмонологии и прочего, ученые бы живо взялись за дело и показали бы, как и какой патент можно обойти! Правда, в этом вопросе необходим и следующий шаг – опытное производство. Пока чуть ли не единственное биотехнологическое производство в России находится в нашем институте.

**ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ИМПОРТУ**

**Сейчас в России выпускается почти 70 % неинновационных препаратов. Как вы считаете, оправданно ли производить субстанцию здесь или проще ее закупать?**

– Только производить! По крайней мере, контрольное производство должно быть здесь – это национальная безопасность страны. России, видимо, нужна большая беда, чтобы

понять, насколько необходимо иметь собственную фармацевтическую промышленность с полным циклом создания хотя бы жизненно важных препаратов. Представьте, что вдруг прекратятся поставки инсулина из-за рубежа, – жизнь сотен тысяч людей, больных сахарным диабетом, окажется под угрозой. Кажется, что такого никогда не будет? Но мы уже получали подобные уроки. Разрабатывать 7-й фактор крови, который останавливает кровотечение, начали только после трагедии в Беслане. Директор Гематологического научного центра РАМН академик **Андрей Иванович Воробьев** звонил мне и сказал, что мы не смогли спасти многих раненых именно из-за недостатка этого препарата. Россия получает его из Дании, но он слишком дорогой и закупается в небольших количествах, в экстренных случаях его попросту не хватает. С инсулином ситуация, как видите, аналогичная... ●

## Главная тема

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

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

[читать полностью](#)

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

Непосредственные участники научных исследований рассказывают как все было на самом деле

[читать полностью](#)

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

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

[читать полностью](#)

## Новости

### Новость дня:



## Наноарт - увидеть невидимое

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



### 31.08.2009 [Наночастицы](#)

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

Фото: [Oberazzi](#)



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

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

Фото: [greenleaves](#)



### 27.08.2009 [В РОСНАНО](#)

Генеральная прокуратура по поручению Президента РФ проводит проверку деятельности пяти госкорпораций

Фото: [gregwake](#)

новости и события  
конференции  
интервью  
нанотехнологии  
образование

экономика  
научные коллективы  
репортажи  
мнения экспертов  
лекции и семинары

УДК 577.27:112.825.083.3

# Фаговый дисплей на основе нитчатых бактериофагов: применение для отбора рекомбинантных антител

Н.В. Тикунова\*, В.В. Морозова

Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН, 630090, Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, 8

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

**РЕФЕРАТ** Дисплей пептидов и белков на поверхности нитчатых бактериофагов является мощной методологией для отбора пептидов и белковых доменов, включая антитела. Преимущество этой методологии заключается в прямой физической сцепленности фенотипа и генотипа – анализируемого полипептида и кодирующего его фрагмента ДНК. Разработка комбинаторных библиотек фрагментов антител обеспечивает наличие репертуаров фаговых частиц, экспонирующих огромное разнообразие фрагментов антител. Процедура биопэннинга облегчает отбор антител с высокой аффинностью и специфичностью практически к любым мишеням. Настоящий обзор является введением в методологию фагового дисплея, более детально он представляет дисплей рекомбинантных антител: конструирование фаговых библиотек фрагментов антител, различные стратегии процедуры биопэннинга.

**Ключевые слова:** фаговый дисплей, нитчатые бактериофаги, фагмиды, комбинаторные библиотеки фрагментов антител, биопэннинг, одноцепочечные антитела, Fab-фрагменты.

## ВВЕДЕНИЕ

В середине 80-х годов была разработана новая молекулярно-биологическая методология, совершившая своеобразную революцию в области инженерии пептидов и белков – фаговый дисплей. Эта методология основана на экспериментах Джорджа Смита, проведенных в середине 80-х годов [1]. На первом этапе Смит доказал возможность экспрессии чужеродного белка на поверхности нитчатого бактериофага M13, осуществив встройку гена, кодирующего фрагмент эндонуклеазы рестрикции EcoRI, в единую рамку трансляции с минорным белком оболочки рIII нитчатого бактериофага. Используя поликлональные антитела, специфичные к эндонуклеазе EcoRI, Дж. Смит показал способность бактериофагов, содержащих химерный белок EcoRI–рIII, специфически связываться с соответствующими антителами. На втором этапе в этой работе было показано, что из смеси бактериофагов дикого типа и бактериофагов со встройкой можно отобрать бактериофаги со встройкой, путем аффинного обогащения, с использованием эндонуклеазы EcoRI в качестве антигена.

Из этих экспериментов последовало два важных вывода: во-первых, используя технологию рекомбинантных ДНК, можно создавать популяции бактериофагов различной представительности ( $10^6 - 10^{11}$  вариантов), при этом каждый отдельный фаг экспонирует на своей поверхности случайный пептид. Такие популяции назвали «комбинаторные фаговые библиотеки». Во-вторых, сцепленность анализируемого полипептида и кодирующего его генетического

материала в составе одной фаговой частицы обеспечивает возможность простого отбора требуемых вариантов и их анализа.

Для обозначения результата экспрессии чужеродных олиго- и полипептидов в составе поверхностных белков жизнеспособных нитчатых фагов Дж. Смитом был предложен термин «фаговый дисплей» (phage display). Кроме того, была разработана методика «биопэннинга» (biopanning), т.е. аффинного обогащения, которая дает возможность отбирать из фаговой библиотеки бактериофаги, несущие встроенные последовательности, имеющие сродство к определенным лигандам. Термин «biopanning» был предложен в 1988 г. [2]

Небольшое число молекул белка рIII в фаговой частице – всего 5 копий, ограничивает применение фагового дисплея для получения на основе нитчатых бактериофагов искусственных иммуногенов. Однако попытки получить бактериофаги, экспонирующие чужеродные пептиды в составе белка рVIII, представленного в вирионе приблизительно тремя тысячами копий, были неудачными. Лишь исследования, проведенные российскими учеными, позволили определить сайт на N-конце белка рVIII, встройка в который экспонируется на поверхности фага, обладает иммуногенностью, но не приводит к существенным нарушениям в морфогенезе нитчатых бактериофагов [3, 4].

В 1990-х годах метод фагового дисплея был использован для экспонирования антигенсвязывающих фрагментов иммуноглобулинов на поверхности бактериофага fd

[5]. В результате появился новый комбинаторный подход к разработке рекомбинантных антител, являющийся альтернативным традиционной гибридомной технологии. При использовании этого подхода фаговая система заменяет все этапы работы после иммунизации животных и удаления селезенки простыми процедурами манипулирования с ДНК и бактериями, сокращая время получения стабильных клонов, продуцирующих антитела, с месяцев до недель и удешевляя этот процесс.

За годы использования фагового дисплея сложились следующие основные направления его применения:

- Фаговый дисплей пептидов
- Изучение рецепторов и картирование сайтов связывания антител
- Создание иммуногенов и нановакцин
- Картирование сайтов связывания субстратов для протеаз и киназ
- Фаговый дисплей белков и белковых доменов
- Отбор антител с заданными свойствами
- Изучение белок-лигандных взаимодействий
- Скрининг экспрессируемых фрагментов кДНК
- Направленная эволюция белков

В настоящем обзоре будут рассмотрены основные принципы и методология фагового дисплея на основе нитчатых бактериофагов. Наибольшее внимание будет уделено дисплею рекомбинантных антител.

### СТРОЕНИЕ И ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ НИТЧАТОГО БАКТЕРИОФАГА

Методология фагового дисплея и успешность ее развития определяется особенностями нитчатых бактериофагов. К настоящему времени известно несколько нитчатых бактериофагов, способных инфицировать грамотрицательные бактерии. Лучше всего охарактеризованы фаги M13, f1 и fd, инфицирующие штаммы *Escherichia coli*, содержащие F-конъюгативную плазмиду. Геном всех этих бактериофагов определен, нуклеотидные последовательности имеют 98 % гомологии [6, 7]. На основании этого сходства, а также вследствие зависимости процесса инфицирования от наличия F-плазмиды данные бактериофаги объединены в группу Ff-фагов.

Геном Ff-фага представлен одноцепочечной ковалентно замкнутой (+)ДНК, 6407(8) н., кодирующей 11 генов. Все гены сгруппированы в геноме согласно их функциям: первая группа (гены II, V, X) кодирует белки, необходимые для репликации фаговой ДНК; вторая группа (гены III, VI, VII, VIII, IX) – белки оболочки; третья группа (гены I, IV, XI) – белки, необходимые для сборки вирионов. Кроме того, в ДНК бактериофага имеется межгенная последовательность (intergenic region), содержащая *ori* для синтеза (+) и (-) цепей ДНК и сайт инициации процесса сборки фаговых частиц (packaging signal).

ДНК Ff-фага заключена в гибкий цилиндр, состоящий из приблизительно 2700 копий белка оболочки pVIII (рис. 1). На одном из концов Ff-фага находится по 5 копий минорных оболочечных белков pIII и pVI, на другом – белки pVII и pIX.

При инфицировании клеток *E. coli* Ff-фагом белок pIII специфически взаимодействует с верхушкой F-пили, представляющей собой белковую трубочку, состоящую из субъ-

единиц пилина. Ретракция пили, вследствие деполимеризации пилиновых субъединиц, притягивает бактериофаг к клетке [8]. После попадания фаговой ДНК в цитоплазму она при помощи ферментов репликации *E. coli* превращается в двуцепочечную плазмидоподобную репликативную форму (RF-молекулу). Такая молекула служит матрицей для транскрипции и трансляции фаговых белков.

Продукция фаговых белков увеличивается по мере накопления RF-молекул, и при достижении определенной концентрации белка pV вновь синтезированная оцДНК обособляется в комплекс ДНК-pV, который необходим для сборки фаговой частицы. Сборка осуществляется в месте плотного контакта клеточной стенки и внутренней мембраны и продолжается до тех пор, пока конец фаговой ДНК не освободится и фаг не выйдет в среду. Сборка фаговых частиц не ведет к лизогении хозяйских клеток, и инфицированные клетки продолжают расти и делиться, хотя и медленнее, чем неинфицированные [9].

### ТИПЫ ВЕКТОРНЫХ СИСТЕМ НА ОСНОВЕ НИТЧАТЫХ БАКТЕРИОФАГОВ

На основе ДНК нитчатых бактериофагов были созданы новые векторные молекулы – «фагмиды», сочетающие свойства плазмиды и фага [10]. Фагмиды содержат *ori* репликации и сигнал упаковки Ff-фага вместе с *ori* репликации выбранной плазмиды, а также ген III, полилинкер и ген устойчивости к антибиототику [11].

Для фагового дисплея были разработаны системы на основе пяти капсидных белков [12], однако наиболее часто используют минорный белок оболочки pIII или мажорный белок оболочки pVIII (рис. 2). Такие векторные системы обозначаются как 3 и 8 системы соответственно [10].

В зависимости от размера чужеродной вставки белок оболочки фага может терять свои первоначальные свойства, при этом нарушаются процесс сборки фаговой частицы или инфицирование клеток, что приводит к нарушению жизнеспособности бактериофага. Для восстановления ин-

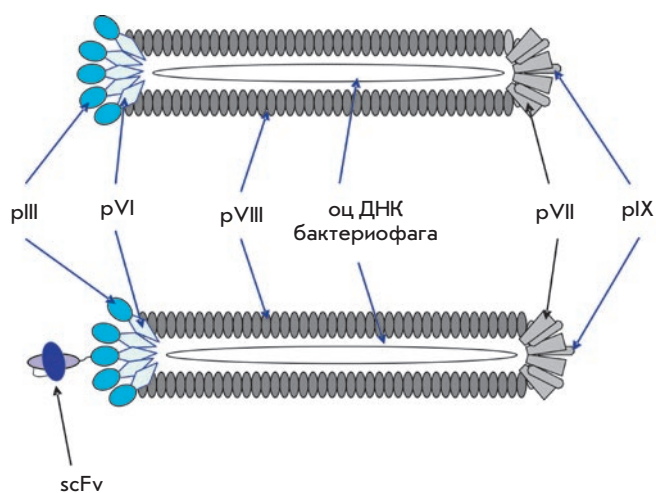


Рис. 1. Схема строения нитчатого бактериофага: а – нитчатый бактериофаг дикого типа; б – фаговое антитело на основе нитчатого бактериофага

фекционности бактериофагов со встройками в оболочечные белки были разработаны такие векторные системы, в которых утраченная фагом инфекционность или способность к нормальной сборке вирионов восстанавливается путем введения дополнительного гена, кодирующего белок рIII или рVIII «дикого» типа. В векторных системах, обозначаемых как 33 или 88, дополнительный ген находится в геноме самого бактериофага вместе с рекомбинантным геном. В векторных системах, обозначаемых 3+3 или 8+8, дополнительный ген вводится в клетку *E.coli* при помощи фага-помощника (helper phage), а рекомбинантный ген находится в фагмиде. В обоих случаях после размножения в клетках бактериофаги содержат как нормальные, так и гибридные белки и могут размножаться, несмотря на наличие чужеродных вставок.

Для векторной системы 8+8 характерна мультивалентность: на поверхности фаговой частицы экспонируются как рекомбинантные, так и дикие белки рVIII, но поскольку рVIII является мажорным белком оболочки, то в среднем на поверхности фага будет экспонировано несколько сотен чужеродных фрагментов. Такое увеличение валентности имеет преимущество в тех случаях, когда необходимо отобрать низкоаффинные лиганды.

Основное свойство 3+3 векторной системы – это фактическая моновалентность: на поверхности фаговой частицы экспонируются как рекомбинантный, так и дикий белок рIII, причем количество копий рекомбинантного белка оболочки варьирует от 0 до 5 на одну фаговую частицу. Следует отметить, что только 10 % бактериофагов содержит хотя бы один химерный белок, количество фагов, несущих 2 и более белка рIII со встройкой, значительно меньше. Около 90 % бактериофагов в популяции вообще не содержат химерных белков [13]. Снижение валентности экспонируемых элементов приводит к ограничению авидности, что позволяет отбирать высокоаффинные молекулы при использовании векторной системы данного типа.

Именно векторная система 3+3 наиболее часто используется для селекции фрагментов антител.

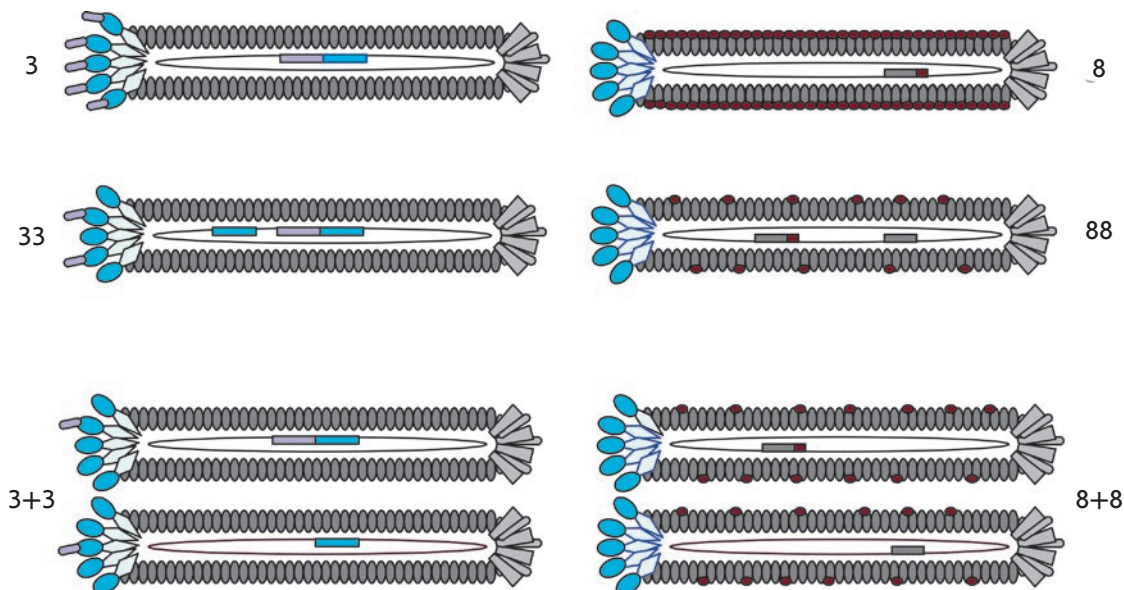
### ОСНОВНЫЕ МЕТОДИЧЕСКИЕ ЭТАПЫ ФАГОВОГО ДИСПЛЕЯ

Для обеспечения успешного отбора целевых антител, обладающих нужными свойствами, необходимо, во-первых, использовать адекватную библиотеку фаговых антител и, во-вторых, выбрать правильную стратегию биопаннинга.

Комбинаторная фаговая библиотека антител представляет собой популяцию бактериофагов, каждый из которых экспонирует на своей поверхности в составе химерного белка с рIII уникальный антиген-связывающий домен антитела, чаще всего одноцепочечное антитело (single chain variable fragment – scFv) или Fab-фрагмент (рис. 3). Особенности строения и свойств этих фрагментов антител описаны в обзоре [14]. Для создания библиотеки репертуар амплифицированных с помощью ПЦР ДНК-фрагментов, кодирующих Fab или scFv из различных источников, клонируют в фагмиду в единую рамку трансляции с геном, кодирующим белок рIII (рис. 4). При этом образуется репертуар фагмид, каждая из которых содержит ДНК-фрагмент, кодирующий индивидуальный антигенсвязывающий домен. После трансфекции *E.coli* полученным репертуаром фагмид получают библиотеку бактериофагов, каждый из которых экспонирует на поверхности индивидуальную комбинацию варьируемых доменов тяжелых и легких цепей. Лигирование ДНК и трансформация бактерий являются ключевыми стадиями, т.к. именно от них зависит размер получаемой библиотеки [15].

Характеристика таких библиотек складывается из уровня аффинности получаемых антител, размера библиотеки и его функционального размера. Аффинность отбираемых антител определяется преимущественно размером библиотеки, который часто лимитирован уровнем трансформации клеток *E.coli*. Размером библиотеки является количество клонов, выросших после трансформации *E.coli*

Рис. 2. Типы векторных систем на основе нитчатого бактериофага для дисплея пептидов и белков. Розовым и красным цветом обозначены чужеродные вставки в генах, кодирующих белки рIII и рVIII соответственно





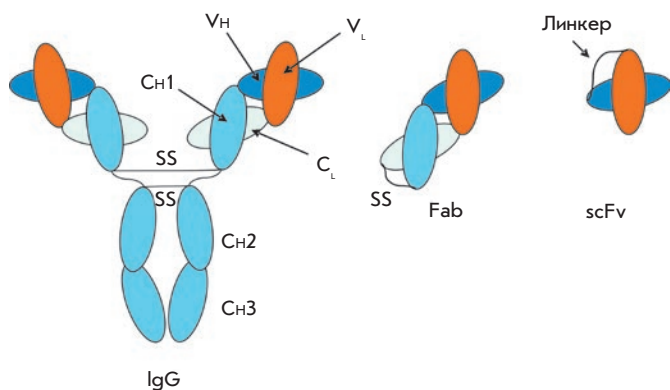


Рис. 3. Природный иммуноглобулин класса G и антигенсвязывающие фрагменты иммуноглобулина

всей популяцией фагмид. Значительно важнее оценивать функциональный размер библиотеки, т.е. количество клонов, содержащих корректно собранные гены, без делеций, сдвига рамки считывания и стоп-кодонов. Функциональный размер библиотеки всегда несколько ниже по сравнению с исходным, но именно он будет определять свойства отбираемых антител [16].

Для отбора целевых антител проводят процедуру биопэннинга – аффинного обогащения библиотеки антителами, специфическими к целевому антигену (рис. 5). Для этого иммобилизованный антиген инкубируют с фаговой библиотекой, затем несвязавшиеся фаговые антитела удаляют, а связавшиеся элюируют и используют для инфицирования клеток *E.coli*. Нарботанные в *E.coli* бактериофаги выделяют и используют для следующего раунда биопэннинга. В идеальном случае достаточно всего лишь одного раунда биопэннинга, но неспецифическое связывание ограничивает степень обогащения за один цикл, и на практике требуется несколько раундов селекции.

Впоследствии из обогащенной библиотеки отбирают индивидуальные антитела, направленные к целевому антигену.

### ТИПЫ ФАГОВЫХ БИБЛИОТЕК АНТИТЕЛ

Существует два типа создаваемых *in vitro* фаговых библиотек антител: т.н. «натуральные» и «синтетические» библиотеки, которые подразделяются согласно используемым репертуарам генов.

В настоящее время ряд фаговых библиотек антител получены полностью или частично из натуральных источников: на основе выделенной из периферических лимфоцитов, костного мозга или селезенки мРНК, кодирующей иммуноглобулины [17, 18]. Особый интерес представляют библиотеки антител человека, поскольку полученные из них антитела могут быть использованы в терапии без ограничения.

Так как большинство семейств, кодирующих V-гены человека, редко используются при иммунном ответе, для конструирования библиотек отбираются наиболее часто встречающиеся при иммунном ответе генные семейства:  $V_{H1} - V_{H3}$  (из семейств генов тяжелой цепи) и  $V_{L1} - V_{L4}$ ,

а также  $V_{\lambda 1} - V_{\lambda 3}$  (из семейств генов легких цепей антител). В разнообразие конструируемых библиотек вносят свой вклад как случайная рекомбинация легкой и тяжелой цепей антитела, так и изменчивость гипервариабельных районов (complementarity determining region – CDR)  $V_H$  и  $V_L$  цепей.

Натуральные библиотеки антител делятся на «иммунные» (immune) и «наивные» (naïve). Иммунные библиотеки, сконструированные из периферических лимфоцитов людей, иммунизированных каким-либо антигеном, представляют большой интерес для медицинских исследований, т.к. в этом случае более вероятно отобрать антитела, перспективные для терапии [19].

«Наивные» библиотеки, сконструированные на основе мРНК лимфоцитов неиммунизированных здоровых людей, используют для получения антител, специфически направленных к множеству антигенов, в т.ч. и к собственным аутоантигенам [20]. Сконструированные «наивные» библиотеки в большей степени представляют исходный репертуар антител.

Для повышения разнообразия, размера и улучшения свойств антител разработали и стали применять «синтетические библиотеки». Синтетические фаговые библиотеки антител делятся на две группы:

1) синтетические библиотеки на основе одной коровой последовательности V-гена;

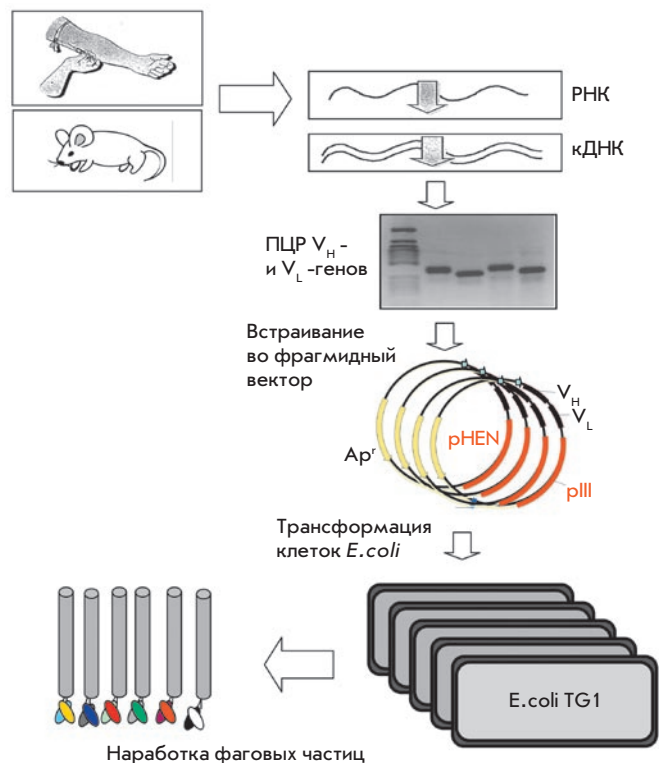


Рис. 4. Схема конструирования фаговой библиотеки фрагментов антител

2) синтетические библиотеки на основе множества коровых V-генов.

Библиотеки первого типа конструируют на основе одного базового гена, в котором с помощью мутагенеза изменяются либо все CDR-районы, либо CDR-районы только V<sub>H</sub>-доменов. При этом разнообразие зависит только от вырожденности синтетической ДНК, используемой для изменения последовательностей CDR-петель.

Синтетические библиотеки, сконструированные на основе единой коровой последовательности, имеют ряд преимуществ: их легче конструировать, быстрее анализировать полученные антитела. Однако остается открытым вопрос о том, сможет ли одна коровая последовательность обеспечить корректный фолдинг разнообразным CDR-районам, связывающим антиген, чтобы при этом получилась библиотека, генерирующая широкий спектр высокоаффинных антител.

Синтетические библиотеки второго типа используют в качестве базового не один, а несколько десятков генов, в которых с помощью мутагенеза изменяют либо все CDR-участки, либо только CDR3-участки переменных доменов тяжелых цепей иммуноглобулинов.

При создании как натуральных, так и синтетических библиотек можно использовать различные типы генов, кодирующих экспонируемые на поверхности фаговой частицы антигенсвязывающие домены – Fab, scFv. При этом, соответственно, будут получены комбинаторные фаговые библиотеки Fab- или scFv-фрагментов антител.

Начиная с 1990 г., когда MacCafferty с соавт. впервые продемонстрировали возможность создания библиотеки одноцепочечных антител на поверхности нитчатого бактериофага [5], множество исследований было посвящено разработке библиотек scFv-фрагментов и изучению отобранных из них рекомбинантных антител. Для создания библиотеки одноцепочечных антител популяции V<sub>H</sub>- и V<sub>L</sub>-генов объединяют в единую ДНК-последовательность с помощью олигонуклеотида, кодирующего гибкий гидрофильный пептид (рис. 3). Этот линкер состоит из аминокислотных остатков глицина и серина (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>n</sub>, что обеспечивает гибкость и резистентность к протеазам. Затем полученные scFv-гены клонируют в какой-либо вектор (pHEN1, pHEN2, pSEX и т.д.), который обеспечивает экспрессию scFv-антител в составе химерного белка с оболочечным белком рIII нитчатых бактериофагов. Следует отметить, что наиболее часто тяжелая цепь располагается сразу же за лидерной последовательностью, тогда как легкая цепь фрагмента антитела является слитой с N-концевой последовательностью белка рIII бактериофага. Пептидный линкер облегчает ассоциацию переменных доменов тяжелой и легкой цепей, необходимую для формирования антигенсвязывающей поверхности, и, таким образом, не требуется наличия дисульфидных связей между цепями.

Для очистки и дальнейшей характеристики одноцепочечных антител удобно получать эти белки в секреторируемой форме. В случае использования pHEN, pSEX векторов между 3'-концом антитела и 5'-концом гена белка оболочки фага находится амбер-кодон, и при смене супрессорного штамма на несупрессорный одноцепочечные антитела секретируются в культуральную среду [21].

Fab-фрагменты – это гетеродимеры, состоящие из легкой цепи иммуноглобулинов (V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>), объединенной с переменной доменом и первым константным доменом тяжелой цепи (V<sub>H</sub>-C<sub>H1</sub>); цепи взаимодействуют друг с другом уже после синтеза обеих цепей, и это взаимодействие стабилизирует формирование антигенсвязывающего сайта (рис. 3). Для создания Fab-библиотеки легкую цепь и Fd-домен (V<sub>H</sub> + C<sub>H1</sub>) клонируют в соответствующем векторе. Ген, кодирующий Fd-домен, объединяют с C-концевой частью белка рIII нитчатого бактериофага. Легкая цепь и тяжелая цепь, слитая с белком рIII нитчатого бактериофага, таким образом, транскрибируются как полицистронная мРНК под контролем какого-либо промотора *E.coli*. На N-конце каждого полипептида располагается лидерная последовательность, которая направляет их к внутренней мембране, где они собираются в фаговую частицу.

Более широкий репертуар Fab-фрагментов может быть получен при последовательной трансформации клеток плазмидой, содержащей V<sub>H</sub>C<sub>H1</sub>-цепи и трансфекции этой же культуры популяцией фагов с репертуаром V<sub>L</sub>C<sub>L</sub>-цепей. В этом случае необходимо обеспечить полную рекомбинацию цепей, чтобы они упаковывались в одну фаговую частицу для последующей селекции на антигене. Для этого был предложен способ рекомбинации H- и L-цепей *in vivo* путем включения в плазмидную и фагидную конструкции loxP-сайтов для рекомбиназы фага P1 и использования в качестве штамма-хозяина клетки *E.coli*, продуцирующей рекомбиназу фага [22].

По сравнению с одноцепочечными антителами Fab-фрагменты обычно более стабильны в очищенной форме, обладают более длинным периодом полувыведения и, следовательно, улучшенной фармакокинетикой и фармакодинамикой [14]. Большое значение имеет и то, что Fab-фрагменты могут быть достаточно просто переведены в полноразмерные иммуноглобулины путем объединения C-конца C<sub>H1</sub> домена с Fc-фрагментом.

### КОНСТРУИРОВАНИЕ БИБЛИОТЕК

При конструировании комбинаторных библиотек антител, в зависимости от типа создаваемой библиотеки, используют различные источники генного репертуара. «Наивные» и иммунные библиотеки конструируют, используя естественным образом реорганизованные гены, кодирующие переменные домены иммуноглобулинов здоровых или иммунных к какому-либо антигену доноров, соответственно (рис. 4). Для этого выделяют мРНК клеток лимфоидного ряда, продуцирующих антитела. Чаще всего это лимфоциты периферической крови, но в некоторых случаях используют спленоциты [23, 24], клетки миндалин или В-лимфоциты костного мозга [25, 26]. Для создания иммунной библиотеки антител возможно также использование предварительной иммунизации периферических лимфоцитов крови *in vitro* [27, 28].

На основе мРНК синтезируют кДНК, при этом в качестве праймеров могут быть использованы не только специфические олигонуклеотиды, но и олиго-dT и статистические гексаолигонуклеотиды, что позволяет получать кДНК копии всех возможных вариантов генов, кодирующих переменные домены антител [29]. Кроме того, можно использовать один или несколько праймеров, ограничивающих набор амплифицируемых генов до одного или нескольких

семейств генов переменных доменов или изоформ антител уже на уровне кДНК [30]. Для дизайна праймеров используют информацию из баз данных, например, Data-Base Kabat [31] или V BASE. Последовательность праймеров обычно содержит сайты рестрикции для клонирования ПЦР-продуктов в составе соответствующих векторов.

**Конструирование «наивной» библиотеки scFv** антител человека было осуществлено Marks с соавт. [30]. Источником генов, кодирующих антитела, были лимфоциты периферической крови двух добровольцев. При синтезе кДНК использовались праймеры, комплементарные консервативным районам генов, кодирующих легкие цепи  $\kappa$  и  $\lambda$  типов и тяжелые цепи IgM и IgG. На основе полученных кДНК в векторе pHEN1 было сконструировано две библиотеки:  $V_{H\mu} - V_L$  размером  $2.9 \cdot 10^7$  и  $V_{H\gamma} - V_L$  размером  $1.6 \cdot 10^8$  независимых клонов [30]. Из этой библиотеки были получены различные антитела, специфичные к белкам и гаптенам [30], и антитела, специфичные к аутоантигенам [32], однако константы аффинности отобранных scFv не превышали  $10^7 \text{ M}^{-1}$ . Вместе с тем даже из библиотек относительно небольшого размера могут быть получены антитела, обладающие большей аффинностью. Так, из scFv-библиотеки размером  $4 \cdot 10^7$  независимых клонов были отобраны одноцепочечные антитела с константами аффинности  $K_{\text{афф}} 10^7 - 10^8 \text{ M}^{-1}$ , специфичные к различным стероидным гормонам [33]. Одноцепочечные антитела к фактору некроза опухолей с константами аффинности порядка  $10^7 - 10^8 \text{ M}^{-1}$  отобраны из наивной библиотеки размером  $2 \cdot 10^8$  независимых клонов. Для увеличения представительности этой библиотеки была модифицирована схема конструирования scFv-генов: в отличие от работы [30], в которой scFv-гены конструировали с помощью трехкомпонентной ПЦР ( $V_H - \text{линкер} - V_L$ ), здесь была проведена более эффективная двухкомпонентная реакция за счет наличия рестрикционного сайта в линкерной последовательности [16].

Дальнейшие усилия экспериментаторов были направлены на конструирование как можно большего универсального репертуара фрагментов антител, поскольку из большого репертуара ( $10^{10} - 10^{11}$ ) возможно выделить антитела с наномолярными аффинностями против практически любого антигена. Подобная библиотека размером  $1.4 \cdot 10^{10}$  была сконструирована на основе генетического материала лимфоидных клеток (периферических лимфоцитов крови и миндалин, В-лимфоцитов костного мозга) 43 неиммунных доноров [25]. Репертуары  $V_H$ - и  $V_L$ -генов были предварительно клонированы по отдельности в векторы pCantab 6 и pCantab 3His<sub>6</sub> соответственно. Аффинность отобранных из этой библиотеки scFv превышала  $10^9 \text{ M}^{-1}$ . Как известно, антитела с такой аффинностью появляются в ходе вторичного иммунного ответа. Кроме того, из сконструированной библиотеки были отобраны антитела к различным токсичным антигенам, которые невозможно использовать для иммунизации, что говорит о преимуществах использования больших библиотек по сравнению с гибридной технологией [10]. Из этой же библиотеки были отобраны антитела к антигенам клеточной поверхности [34] и антитела, специфично связывающее углеводы [35]. Наивные библиотеки одноцепочечных антител использовали также для получения scFv, специфичных к нейротоксинам [36], к белкам апоптоза [37] и пр.

При создании большой «наивной» библиотеки Fab-фрагментов антител человека использовали двухэтапную процедуру клонирования [24]. Сначала отдельно клонировали амплифицированные  $V_H$ -,  $V_{L\kappa}$ - и  $V_{L\lambda}$ -гены в вектора, содержащие  $C_{H1}$ -,  $C_{L\kappa}$ - и  $C_{L\lambda}$ -гены соответственно. А затем использовали уже не ПЦР-продукты, обработанные соответствующими рестриктазами, а рестрикционные фрагменты, полученные из первичных репертуаров  $V_H C_{H1}$ ,  $V_{L\kappa} C_{L\kappa}$  и  $V_{L\lambda} C_{L\lambda}$ , что сделало процедуру клонирования более эффективной. Как и в работах по созданию библиотек одноцепочечных антител олигонуклеотиды для амплификации переменных доменов были подобраны так, чтобы как можно более полно охватить весь их репертуар. Размер полученной в итоге библиотеки Fab-фрагментов составил  $3.7 \cdot 10^{10}$  независимых клонов, и из нее были отобраны антитела против широкой панели антигенов с аффинностью, варьирующей в пределах от  $2.7 \cdot 10^7$  до  $3.7 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ .

**Конструирование синтетических библиотек.** Комбинаторные библиотеки характеризует не только размер, определяемый по количеству независимых трансформантов, но и представительность, т.е. общее количество различных  $V_H - V_L$  комбинаций, полученных на уровне ДНК. Способом увеличения разнообразия антител в конструируемой библиотеке может быть увеличение количества доноров, что характерно для натуральных библиотек, но в этом случае репертуар генов, кодирующих антитела, не превысит разнообразия генов лимфоидных клеток, доступных на момент создания библиотеки. По мнению многих авторов, потенциальный размер репертуара антител человека составляет до  $10^{12}$ , но одновременно клетки, продуцирующие антитела, представляют только его часть [37, 38]. Представительность конструируемой библиотеки может быть увеличена за счет замены природных CDR-участков V-генов на химически синтезированные. В этом случае возможно получить комбинаторную библиотеку, содержащую все возможные варианты последовательностей, кодирующих антигенсвязывающие центры антител. Сконструированные подобным образом комбинаторные библиотеки фрагментов антител принято называть синтетическими или полусинтетическими, в зависимости от того, входят ли в состав обоих переменных доменов синтетические участки. Идеальным способом получения репертуара, охватывающего все возможные варианты последовательностей антител, является химический синтез всех шести рандомизированных CDR-районов и соединение их с различными каркасными участками. Но чаще всего рандомизации подвергается CDR3 тяжелой цепи, который вносит наиболее существенный вклад в формирование антигенсвязывающего центра [39].

Первую полусинтетическую библиотеку сконструировали на основе одной легкой цепи без каких-либо изменений в структуре CDR и одной тяжелой цепи, в которой участок CDR3 был заменен примерно на  $10^{20}$  различных вариантов последовательностей [37]. Размер библиотеки составил  $5 \cdot 10^7$  клонов, аффинности отобранных антител варьировали от  $10^7$  до  $10^8 \text{ M}^{-1}$ .

Позднее при конструировании полусинтетических библиотек на основе одной коровой последовательности мутагенезом изменяли все гипервариабельные районы тяжелой цепи [40]. При этом, выбирая позиции для мутагенеза, учитывали особую вариабельность в последовательностях

природных антител и необходимость хорошей растворимости целевых антител. Эти выбранные позиции были рандомизированы, используя кодоны, которые наиболее часто обнаруживаются в природных антителах.

Наряду с созданием полусинтетических библиотек на основе одной коровой последовательности конструировали библиотеки и на основе репертуара  $V_H$ -генов [41, 42]. Так, в библиотеке Nissim использовали 50  $V_H$ -генных сегментов, кодирующих большую часть V-сегментов человека, и случайные нуклеотидные последовательности, кодирующие  $V_H$  CDR3 длиной от 12 до 36 п.о. В результате было получено девять  $V_H$ -генных репертуаров, различающихся по длине  $V_H$  CDR3, и, таким образом, созданы девять фагмидных библиотек. Размер библиотеки, полученной после их объединения, составил  $10^8$  независимых клонов, и из нее были отобраны антитела против целого ряда антигенов [42].

Еще одна использовавшаяся многими исследователями библиотека Griffin 1 была аналогичным образом сконструирована на основе 50 зародышевых линий генов Vh-доменов тяжелых цепей и генов 6 различных переменных доменов легких цепей, соответствующих шести основным подтипам  $\kappa$ - и  $\lambda$ -цепей. Размер библиотеки составлял  $10^8$  независимых клонов, и из нее отобраны антитела, специфичные к растворимому рецептору CD4 [43], интерлейкину 6 человека [44], ортопоксвирусу [45], нуклеопротеину вируса Эбола [46]. Эту библиотеку использовали для отбора каталитических антител [47] и пр. [48]

Аффинность антител, полученных из созданных таким образом полусинтетических и синтетических библиотек, не была высокой. Это обусловлено несколькими факторами. Известно, что CDR3 тяжелых цепей в природных антителах сильно варьируют по размеру и могут содержать до 24 аминокислотных остатков, однако создание синтетических CDR3 с большим разбросом длины и полностью случайной структурой малоэффективно. Кроме того, зачастую конформация антител, содержащих синтетические CDR, является некорректной (относительно природной) именно в области CDR-петель [49]. Поэтому исследователи попытались обойти эти препятствия путем ограниченной «рандомизации» и введения фланкирующих участков, окружающих полностью случайные аминокислотные последовательности [49]. В результате была создана библиотека размером  $3.6 \cdot 10^8$  клонов, из которой были отобраны scFv к 13 различным антигенам, хотя аффинность отобранных антител оставалась низкой – от  $4 \cdot 10^5$  до  $10^7$   $M^{-1}$ .

Дальнейшие шаги, связанные с преодолением описанных выше ограничений, зависят от использования т.н. «мастер-генов», т.е. генов, кодирующих переменные домены антител с определенными каркасными участками, ограничивающими различные рандомизированные CDR. Так, для создания библиотеки HuCAL в качестве «мастер-генов» использовали  $V_H$ - и  $V_L$ -семейства, наиболее часто встречающиеся при иммунном ответе, в результате чего 7 V-генов тяжелых цепей и 7 V-генов легких цепей составили комбинацию из 49 базовых генов. Все гены были синтезированы с учетом частоты использования кодонов, кодирующих аминокислотные остатки, которые приводят к белковой агрегации [50]. При создании этой библиотеки авторы учитывали положение ключевых аминокислот в каркас-

ных и гипервариабельных районах, длины гипервариабельных районов и степень их изменчивости. При синтезе олигонуклеотидов, кодирующих CDR3, использовали каскадный тринуклеотидный мутагенез, что исключало из состава CDR-фрагментов терминирующий кодон TAG, а также кодоны, редко встречающиеся в экспрессирующей системе. Из сконструированной библиотеки размером  $2 \cdot 10^9$  были отобраны scFv против широкого спектра антигенов, включающего пептиды, белки и целые клетки, с константами аффинности, соответствующими вторичному иммунному ответу ( $10^9$   $M^{-1}$ ). Для всех использованных консенсусных каркасов построены трехмерные молекулярные модели, что сделало возможным исследование причин разнообразия природных структурных мотивов, типичных для репертуара антител человека, и корреляции между структурой антитела, его аффинностью, специфичностью и классом антигена, который оно связывает [50, 51].

Аналогичным образом была сконструирована библиотека n-CoDeR<sup>TM</sup> [52], для создания которой авторы использовали единственный мастер-ген, в который были встроены различные CDR-районы, сформированные *in vivo*. Поскольку были взяты генные последовательности, кодирующие природные CDR, это гарантировало оптимальный уровень правильно собранных и функциональных молекул. Более того, компьютерный анализ показал, что получаемые из библиотеки CoDeR<sup>TM</sup> молекулы антител менее иммуногенны по сравнению с нормальными человеческими Ig. Из библиотеки были получены антитела, специфичные к углеводам и человеческим аутоантигенам, с аффинностью более чем  $10^9$   $M^{-1}$ .

**Конструирование иммунных библиотек.** Несмотря на то что к настоящему моменту сконструировано много универсальных наивных, полусинтетических и синтетических библиотек, стало очевидно, что главная проблема заключается не в создании огромного репертуара фрагментов антител, а в его сохранении в течение длительного времени и, следовательно, отсрочке неизбежного изменения его содержания. Кроме того, при увеличении размера библиотеки возникают и технические неудобства при работе с ней. Например, для амплификации библиотеки размером  $10^{10}$  клонов требуется объем культуры в несколько десятков литров. Это во многом объясняет современную тенденцию предпочтения библиотек меньшего размера, содержащих узконаправленный репертуар антител, полученных из иммунизированных организмов.

Иммунные библиотеки обладают двумя основными характеристиками: они обогащены антиген-специфичными антителами, и аффинность некоторых из этих антител повысилась в ходе развития иммунного ответа. В результате большую представленность в иммунной библиотеке имеют клоны, продуцирующие высокоаффинные антитела к антигену, использованному для иммунизации, появляющиеся в результате вторичного иммунного ответа на антиген. Считается, что в случае библиотек из иммунизированных организмов достаточно получить  $10^6$  независимых рекомбинантов, чтобы среди них нашлись продуценты scFv, специфично связывающие использованный для иммунизации антиген, тогда как «наивные» библиотеки должны содержать, по крайней мере,  $10^8$  индивидуальных клонов для воссоздания исходного разнообразия детерминант антител [53].

Первыми иммунными библиотеками были библиотеки против ВИЧ [54], респираторного синцитиального вируса [55], вируса гепатита В [56], вируса простого герпеса и цитомегаловируса [57, 58]. Сконструированы библиотеки против аутоантигенов человека [59–61] и против антигенов, способных вызывать аллергические реакции [62].

На основе генетического материала лимфоцитов пациентов с определенными опухолями были сконструированы библиотеки для отбора антител против специфических опухолевых маркеров [63 – 68]. Созданы иммунные библиотеки против вируса гепатита А [19], вируса ветряной оспы [69], ортопоксвирусов [70] и др. Совсем недавно из иммунных библиотек были получены вируснейтрализующие scFv к антигенам вируса гриппа H5N1 [26, 71] и вируснейтрализующие Fab-фрагменты к вирусу бешенства [72]. Также на основе фрагментов антител, отобранных из иммунных библиотек, созданы полноразмерные антитела человека против ортопоксвирусов [73, 74], антитела, способные нейтрализовать вирус гепатита А [75], полноразмерные вируснейтрализующие антитела человека, специфичные к гликопротеину В цитомегаловируса [76].

Существенным преимуществом иммунных библиотек является возможность отбора высокоаффинных антител, появляющихся после вирусных инфекций или рака, а также антител на аутоантигены, представленные у больных с аутоиммунными заболеваниями. Анализ таких антител может помочь в определении антигенных эпитопов, вовлеченных в гуморальный иммунный ответ. Еще одно преимущество иммунных библиотек – это возможность отбора антител против второстепенных или слабо иммуногенных антигенов.

#### АФФИННАЯ СЕЛЕКЦИЯ АНТИТЕЛ ИЗ БИБЛИОТЕКИ

Следующим важнейшим этапом после конструирования библиотеки или выбора из уже имеющихся является обогащение исходного репертуара антител, присутствующих в библиотеке, антителами, специфически направленными к целевому антигену (рис. 5). Эта процедура называется также биопэннингом или аффинным обогащением. Ниже приведены различные стратегии биопэннинга.

**Биопэннинг с использованием иммобилизованных антигенов.** Традиционно биопэннинг проводят с использованием антигена, сорбированного на пластиковой поверхности, например, иммунопробирок (Maxisorb tubes; Nalge Nunc Intl., Naperville, IL) или планшетов для ИФА [30, 78]. Биопэннинг также может быть проведен путем аффинной хроматографии, при этом целевой антиген иммобилизуют на колонку [43, 79]. Колонку промывают, для того чтобы избавиться от неспецифичных клонов, а затем специфично связавшиеся фаговые антитела элюируют с колонки и нарабатывают в клетках *E. coli*. В качестве носителей антигена для аффинной селекции также могут быть использованы чипы сенсоров VIAcore [80]. При биопэннинге таким методом следует учитывать конформационную стабильность антигена. Некоторые фаговые антитела, отобранные против адсорбированных антигенов, могут не распознавать нативную форму антигена. Один из способов обойти эту проблему – непрямая посадка антигена с использованием антигенспецифичных антител [81].

Для элюции специфически связавшихся антител используют растворы кислот, например HCl, глициновый буфер [78, 82], растворы оснований, например триэтиламин [30]. При этом сразу после элюции необходимо нейтрализовать элюат, содержащий фаговые антитела, доведя уровень pH до 7.2–7.4. Антитела также можно элюировать при помощи расщепления протеазой специально введенного сайта между антителом и белком рIII [83]. Кроме того, антитела можно элюировать, используя конкурентное связывание при помощи избытка антигена [16, 43].

**Биопэннинг с использованием раствора антигена.** При иммобилизации антигена на твердую поверхность зачастую возникают проблемы с конформационными изменениями молекул антигена. Для того чтобы избежать нарушений конформации, используют методики, позволяющие антителу связываться с антигеном в растворе. При этом использование меченых растворимых антигенов дает возможность более точной оценки количества антигена, используемого во время селекции [84], и, следовательно, позволяет использовать меньшие концентрации антигена, что приводит к отбору высокоаффинных антител. После инкубации антител с антигеном, пришитым к биотину, фаги, связавшиеся с мечеными антигенами, удаляют при помощи покрытых авидином или стрептавидином парамагнитных шариков. В результате специфично связавшиеся фаги отделяются от антигена и могут быть охарактеризованы. Недостатком этого метода является то, что также отбираются и антитела на стрептавидин. Эта проблема может быть решена добавлением еще одной стадии – инкубации популяции антител с шариками, покрытыми стрептавидином для удаления стрептавидин-специфичных антител.

**Биопэннинг на клетках.** Прямой отбор антител против маркеров на клеточной поверхности может быть проведен

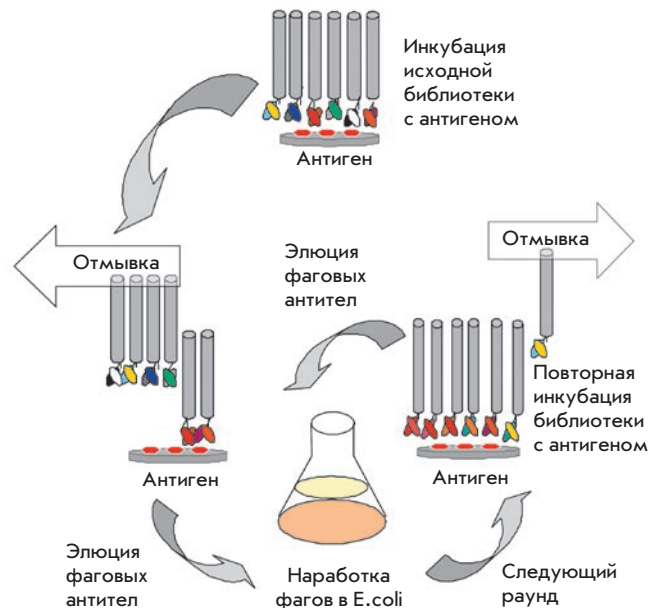


Рис. 5. Схема процедуры биопэннинга

либо на монослой клеток, либо с использованием клеточной суспензии. Несвязавшиеся фаговые антитела удаляют в случае монослоя промыванием чашек с культурами клеток или центрифугированием в случае суспензии. Для того чтобы оптимизировать отбор антигенспецифичных антител и минимизировать отбор случайно связавшихся антител, используют негативную селекцию, которую можно вести перед позитивной селекцией, после нее, а также одновременно [49]. В случае одновременного проведения позитивной и негативной селекции создают конкурентные условия: небольшое число антигенположительных (целевых) клеток и избыток антигенотрицательных «адсорбирующих» клеток, которые связывают неспецифичные антитела из фаговой библиотеки. Для того чтобы отделить нужные клетки со связавшимися к их поверхности фаговыми антителами, используют флуоресцентно меченные антитела, специфичные к другому антигену, заведомо присутствующему на целевых клетках, а затем эти клетки отделяют методом проточной цитометрии (FACS).

Используя подобную методику, из Fab-библиотеки выделили анти-Rh(D) Fab-антитела, представляющие большой интерес для клинического применения [85]. Подобные подходы могут быть использованы для идентификации опухоли-специфичных антигенов и быстрого высокопродуктивного метода отбора фрагментов антител против конформационно зависимых поверхностных клеточных маркеров. Так, scFv-библиотеку подвергли трем раундам позитивной селекции на клетках человеческой меланомы и негативной селекции на человеческих мононуклеарных клетках периферической крови [64]. В результате были отобраны два scFv, распознающие клетки меланомы в ИФА и FACS [64]. Аналогично селекцию можно вести с использованием фрагментов различных тканей.

Разработан способ отбора антител, способных проникать в эукариотические клетки с помощью рецептор-зависимого эндоцитоза. Селекцию в этом случае проводят в условиях, максимально способствующих активному эндоцитозу, в результате чего после лизиса клеток получают популяцию фаговых антител, способных проникать внутрь эукариотических клеток [86, 87]. Предполагается, что такие антитела могут служить средством внутриклеточной доставки различных лекарств.

**Биопэннинг *in vivo*.** Этот метод предполагает введение репертуара фаговых антител непосредственно в организм животных. Затем ткани извлекают и получают фаговые антитела, связавшиеся с тканеспецифичными клеточными маркерами, аналогично тому, как это было сделано в случае пептидных библиотек [88]. Биопэннинг *in vivo* имеет несколько преимуществ: во-первых, выделенные антитела селективно связываются с интактными целевыми мишенями; во-вторых, сразу элиминируются антитела, узнающие нецелевые белки клеточной поверхности и белки плазмы. Антитела, полученные с помощью биопэннинга *in vivo* и биопэннинга на клетках, могут быть полезными в функциональном анализе новых рецепторов и в поиске потенциальных мишеней для новых лекарств.

Следует отметить, что большинство существующих методов селекции антител предполагают отбор к одному или нескольким антигенам. Вместе с тем разработаны стратегии биопэннинга, позволяющие вести параллельный

отбор антител на популяцию различных антигенов – т.н. «двумерный дисплей». Так, было предложено использовать метод мультиплексной проточной цитометрии для одновременной высокопроизводительной селекции индивидуальных антител на множество различных антигенов, представленных на поверхности клеток [89]. Альтернативным методом одновременного отбора на популяцию антигенов является метод комбинаторной селекции пар антиген-антитело, способных к репликации. Подобным образом отобрали из фаговой библиотеки scFv против антигенов, представленных в дрожжевой библиотеке [90].

### ПРОБЛЕМЫ И УСПЕХИ ДИСПЛЕЯ НА ОСНОВЕ НИТЧАТЫХ БАКТЕРИОФАГОВ

При конструировании и использовании библиотек на основе нитчатых бактериофагов многие исследователи сталкиваются с различными трудностями. Так, при конструировании иммунных библиотек существуют проблемы, связанные с низкой концентрацией исходных антигенспецифичных лимфоцитов в популяции. Для преодоления подобных проблем в качестве предварительного этапа при создании такого рода узконаправленных библиотек можно использовать антиген-специфическое обогащение популяции В-лимфоцитов с помощью молекул антигена, присоединенных к магнитным шарикам [91, 92].

Следующая проблема заключается в том, что с помощью процедуры биопэннинга трудно обогатить библиотеку антител так, чтобы впоследствии отбирать специфические антитела, обладающие высокой аффинностью. Еще одна проблема – это уменьшение доли фагов с полноразмерной вставкой в ходе наработки библиотеки. При проверке размеров генов, кодирующих антитела, было показано, что после раунда биопэннинга количество клонов с дефектной вставкой увеличивается [16]. Фаги со вставкой меньшего размера (обычно с отсутствующим  $V_H$  районом) в смешанных культурах имеют тенденцию к более быстрому росту, чем фаги с полноразмерной вставкой, что и приводит к их преимущественной наработке. Именно поэтому так важно правильно выбрать стратегию биопэннинга. Варьируя условия элюции и скрининга в ходе селекции, можно добиться отбора высокоаффинных антител.

Еще одна проблема связана с тем, что существуют значительные различия между теоретически возможным разнообразием, обеспечиваемым всей популяцией фагмид конкретных библиотек, и реально представленным разнообразием антител. Наличие таких различий объясняется не только пределом эффективности трансформации. Причинами могут быть также токсичность для клеток антител, продуцируемых в ходе бактериальной экспрессии, неправильный фолдинг или сборка, конкуренция между диким типом белка рIII и химерным белком, протеолиз экспонированного на поверхности фага антигенсвязывающего домена и некоторые другие.

Вместе с тем, несмотря на существующие методические проблемы, технология фагового дисплея успешно развивается. Эта технология является привлекательным инструментом по ряду причин. Используя фаговые библиотеки фрагментов антител человека, можно отказаться от применения для терапии химерных или гуманизированных антител и, таким образом, избежать проблем, связанных

с иммуногенностью препаратов. Библиотеки фрагментов антител позволяют быстро изолировать специфические антиген-связывающие домены человеческого происхождения без ограничений, связанных с доступностью донорских лимфоцитов или проблемами слияния клеток. Еще одним преимуществом комбинаторных библиотек является их универсальность – возможность использования одной библиотеки для неоднократного скрининга против различных антигенов. Несомненным достоинством данной технологии является возможность отказа от использования лабораторных животных, а также относительная простота в исполнении и возможность скрининга большого количества кандидатных молекул за короткий промежуток времени. Чрезвычайно важной является возможность отбора анти-

тел против широкого круга антигенов, включая токсичные вещества или особо опасные вирусы, иммунизация которыми невозможна по этическим причинам. Технология фагового дисплея уже доказала свою эффективность в разработке терапевтических антител. В последние годы только на фармацевтическом рынке США продается более 14 антител, антигенсвязывающие домены которых получены методом фагового дисплея [15]. Все это объясняет факт притока крупных компаний, таких как Morphosys GmbH (Германия; <http://www.morphosys.com>); Cambridge Antibody Technology (Великобритания; <http://www.catplc.co.uk>) и Duax (США; <http://www.duax.com>) и др., в область разработки и применения комбинаторных фаговых библиотек фрагментов антител. ●

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Smith G. // *Science*. 1985. V. 228. P. 1315–1317.
- Parmley S., Smith G. // *Gene*. 1988. V. 73. P. 305–318.
- Ильичев А., Миненкова О., Татков С. и др. // Доклады АН СССР. 1989. Т. 307. С. 481–483.
- Minnenkova O., Ilyichev A., Kishchenko G. // *Gene*. 1993. V. 128. P. 85–88.
- MacCafferty J., Griffiths A., Winter G., et al. // *Nature*. 1990. V. 348. P. 552–554.
- Van Wezenbeek P., Huloenmakers J.G. // *Gene*. 1980. V. 11. P. 129–148.
- Beck E., Zink B. // *Gene*. 1981. V. 16. P. 35–58.
- Maneewannakul K., Maneewannakul S., Ippen-Ihler K. // *J. Bacteriol.* 1993. V. 175. P. 1384–1391.
- Model P., Russel M. *The bacteriophages*. V. 2. N.Y.: Plenum, 1988. P. 456.
- Kay B., Winter G., McCafferty J. *Phage display of peptides and proteins: a laboratory manual*. N.Y.: Academic press. 1996. P. 306.
- Mead D., Kemper B. // *Biotechnology*. 1988. V. 10. P. 85–102.
- Mullen L., Nair S., Ward J., et al. // *TRENDS in Microbiol.* 2006. V. 14. P. 141–147.
- Griffiths A., Duncan A. // *Curr. Opin. Biotech.* 1998. V. 9. P. 102–108.
- Деев С., Лебедево Е. // *Acta Naturae*. 2009. Т. 1. С. 32–50.
- Azzazy H., Highsmith W. // *Clin. Biochem.* 2002. V. 35. P. 425–445.
- Батанова Т., Улитин А., Морозова В. и др. // *Мол. генет. микробиол. вирусол.* 2006. Т. 3. С. 35–41.
- Blazek D., Celer V. // *Folia Microbiol.* 2003. V. 48. P. 687–698.
- Chingwei V., Blazek D., Celer V., et al. // *J. Virol. Methods*. 2004. V. 115. P. 83–82.
- Kim S., Jang M., Stapleton J., et al. // *Virology*. 2004. V. 318. P. 598–607.
- Nagano K., Imai S., Mukai Y., et al. // *Pharmazie*. 2009. V. 64. P. 238–241.
- Barbas C. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 1993. V. 4. P. 526–530.
- Zahra D., Vancov T., Dunn J., et al. // *Gene*. 1999. V. 227. P. 49–54.
- Sheets M., Amersdorfer P., Finnern R., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. V. 95. P. 6157–6162.
- de Haard H., van Neer N., Reurs A., et al. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 18218–18230.
- Vaughan T., Williams A., Pritchard K., et al. // *Nat. Biotechnol.* 1996. V. 14. P. 309–314.
- Kashyap A., Steel J., Oner A., et al. // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008. V.105. P. 5986–5991.
- Yamashita M., Katakura Y., Shim S., et al. // *Cytotechnology*. 2002. V. 40. P.161–165.
- Yamashita M., Katakura Y., Shirahata S. // *Cytotechnology*. 2007. V. 55. P. 55–60.
- Улитин А., Капралова М., Ламан А. и др. // *ДАН*. 2005. Т. 405. С. 1–4.
- Marks J., Hoogenboom H., Bontert T., et al. // *J. Mol. Biol.* 1991. V. 222. P. 581–597.
- Johnson G., Wu T. // *Nucleic Acids Res.* 2001. V. 29. P. 205–206.
- Griffiths A., Malmqvist M., Marks J., et al. // *EMBO J*. 1993. V. 12. P. 725–734.
- Dorsam H., Rohrbach P., Kurscher T., et al. // *FEBS Lett.* 1997. V. 1. P. 7–13.
- Hoogenboom H., Lutgerink J., Pelsers M., et al. // *Eur. J. Biochem.* 1999. V. 260. P. 774–784.
- Foy B., Killeen G., Frohn R., et al. // *J. Immunol. Methods*. 2002. V. 261. P. 73–83.
- Cardoso D., Nato F., England P., et al. // *Scand. J Immunol.* 2000. V. 51. P. 337–344.
- Barbas C., Bain J., Hoekstra D., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992. V. 89. P. 4445–4457.
- Winter G., Griffiths A., Hawkins R., et al. // *Annu. Rev. Immunol.* 1994. V. 12. P. 433–455.
- Xu J., Davis M. // *Immunity*. 2000. V. 13. P. 37–45.
- Lee C., Sidhu S., Fuh G. // *J. Immunol. Meth.* 2004. V. 284. P. 119–132.
- Tomlinson I., Walter G., Marks J., et al. // *J. Mol. Biol.* 1992. V. 227. P. 776–798.
- Nissim A., Hoogenboom H., Tomlinson I., et al. // *EMBO J*. 1994. V. 13. P. 692–698.
- Griffiths A., Williams S., Hartley O., et al. // *EMBO J*. 1994. V. 13. P. 3245–3260.
- Krebs V., Griffin H., Winter G., et al. // *J Biol Chem*. 1998. V. 273. P. 2858–2865.
- Tikunova N., Morozova V., Batanova T., et al. // *Hum. Antibodies*. 2001. V. 10. P. 95–99.
- Тикунова Н., Батанова Т., Чепурнов А. // *Вопр. вирусол.* 2005. Т. 50. С. 25–29.
- Reshetnyak A., Armentano M., Ponomarenko N., et al. // *J Am. Chem. Soc.* 2007. V. 129. P. 16175–16182.
- Морозова В., Тикунова Н., Батанова Т. // *Вестник РАМН*. 2004. С. 22–27.
- de Kruijff J., Boel E., Logtenberg T. // *J. Mol. Biol.* 1995. V. 248. P. 97–105.
- Knappik A., Ge L., Honegger A., et al. // *J. Mol. Biol.* 2000. V. 296. P. 57–86.
- Rothe C., Urlinger S. // *J. Mol. Biol.* 2008. V. 376. P. 1182–1200.
- Carlsson R., Soderlind E. // *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 2001. V. 1. P. 102–108.
- Gavilondo J., Larrick J. // *Biotechniques*. 2000. V. 29. P. 128–138.
- Burton D., Barbas C., Persson M., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991. V. 88. P. 10134–10137.
- Barbas C., Crowe J., Cababa D., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992. V. 89. P. 10164–10168.
- Zebedee S., Barbas C., Hom Y., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992. V. 89. P. 3175–3179.
- Williamson R., Burioni R., Sanna P., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993. V. 90. P. 4141–4145.
- Burioni R., Williamson R., Sanna P., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994. V. 91. P. 355–359.
- Welschhof M., Terness P., Kolbinger F., et al. // *J. Immunol. Methods*. 1995. V. 179. P. 203–214.
- Chapal N., Chardes T., Bresson D., et al. // *Endocrinology*. 2001. V. 142. P. 4740–4750.
- Raats J., Roeffen W., Litjens S., et al. // *Eur. J. Celliol.* 2003. V. 82. P. 131–141.
- Padavattan S., Flicker S., Scrimmer T., et al. // *J. Immunol.* 2009. V. 182. P. 2141–2151.
- Mao S., Gao C., Lo C., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999. V. 96. P. 6953–6958.
- Kupsch J., Tidman N., Kang N., et al. // *Clin. Cancer Res.* 1999. V. 5. P. 925–931.
- Li J., Pereira S., Van Belle P., et al. // *J. Immunol.* 2001. V. 166. P. 432–438.
- Schmidt A., Muller D., Mersmann M., et al. // *Eur. J. Biochem.* 2001. V. 268. P. 1730–1738.
- Dantas-Barbosa C., Brigido M., Maranhao A. // *Genet. Mol. Res.* 2005. V. 4. P. 126–140.
- Figini M., Obici L., Mezzanatica D., et al. // *Cancer Immunol. Immunother.* 2009. V. 58. P. 531–546.
- Kausmally L., Waalen K., Loberli I., et al. // *J. Gen. Virol.* 2004. V. 85. P. 3493–3500.
- Дубровская В., Улитин А., Ламан А. и др. // *Мол. Биол.* 2007. Т. 41. С. 173–185.
- Throsby M., van der Brink E., Jongeneelen M., et al. // *PLoS One*. 2008. V. 3. P. 3942.
- Houimel M., Dellagi K. // *J Virol. Methods*. 2009. V. 161. P. 205–215.
- Schmaljohn C., Cui Y., Kerby S., et al. // *Virology*. 1999. V. 258. P. 189–200.
- Юн Т., Тикунова Н., Шингарова Л. и др. // *ДАН*. 2007. Т. 407. С. 98–101.
- Cao J., Meng S., Li C., et al. // *J. Med. Virol.* 2008. V. 80. P. 1171–1180.
- Ohta A., Fujita A., Murayama T., et al. // *Microbes Infect*. 2009. V. 11. P. 1029–1036.
- Cai X., Garen A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995. V. 92. P. 6537–6541.
- Kang A., Barbas C., Janda K., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991. V. 88. P. 4363–4366.
- Garrard L., Henner D. // *Gene*. 1993. V. 128. P. 103–109.
- Malmberg A., Duenas M., Ohlin M., et al. // *J. Immunol. Methods*. 1996. V. 198. P. 51–57.
- Sanna P., Williamson R., De Logu A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995. V. 92. P. 6439–6443.
- Roberts B., Markland W., Siranosian K., et al. // *Gene*. 1992. V. 121. P. 9–15.
- Ward R.L., Clark M.A., Lee J., et al. // *J. Immunol. Methods*. 1996. V. 189. P. 73–82.
- Hawkins R., Russell S., Winter G. // *J. Mol. Biol.* 1992. V. 226. P. 889–896.
- Siegel D., Chang T., Russell S., et al. // *J. Immunol. Methods*. 1997. V. 206. P. 73–85.
- Nielsen U., Marks J. // *Pharm. Sci. Technol. Today*. 2000. V. 3. P. 282–291.
- Poul M. // *Meth. Mol. Biol.* 2009. V. 562. P. 155–163.
- Pasqualini R., Ruoslahti E. // *Nature*. 1996. V. 380. P. 364–366.
- Ayriss J., Valero R., Bradbury A., et al. // *Methods mol. Biol.* 2009. V. 525. P. 241–260.
- Bowley D., Jones T., Burton D., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. P. 1380–1385.
- Koefoed K., Farnes L., Wang M., et al. // *J. Immunol. Methods*. 2005. V. 297. P. 187–220.
- Ditzel H. // *Methods Mol. Biol.* 2009. V. 562. P. 37–43.

УДК 577.112.389.4

# Химические и функциональные аспекты посттрансляционной модификации белков

Д. Г. Кнорре, Н.В. Кудряшова, Т.С. Годовикова\*

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

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

**РЕФЕРАТ** В обзоре рассмотрены химические и функциональные аспекты посттрансляционной модификации белков, получаемые присоединением различных групп к боковым радикалам аминокислотных остатков полипептидного остова белков. Описаны основные простетические группы и на примере пиридоксалевого катализа показано взаимодействие этих групп и апофермента в каталитическом акте. Значительное внимание уделено участию посттрансляционной модификации белков в регуляции биохимических процессов в живых организмах, в особенности роль протеинкиназ и взаимосвязанных с ними фосфатаз. Описаны реакции метилирования и ацетилирования и их роль в «гистоновом коде», управляющем на стадии транскрипции экспрессией генома. Рассмотрены процессы модификации белков объемными гидрофобными радикалами и их значение для функционирования белков, связанных с мембранами. Большое внимание уделено процессам гликозилирования белков, ведущего к образованию гликопротеинов. Приведены основные процессы неферментативной модификации белков – гликирование, гомоцистеинилирование и дезамидирование остатков амидов дикарбоновых кислот.

**Ключевые слова:** белки, ферменты, посттрансляционная модификация, простетические группы, фосфорилирование, регуляция, передача сигналов, ацилирование, алкилирование, убиквитилирование, гистоновый код, неферментативная модификация.

**Список сокращений:** CoA – кофермент А, EGFR – рецептор эпидермального фактора роста, JNK – Jun N-terminal kinase (N-концевая киназа Jun), SAPK – Stress Activated Protein Kinase (протеинкиназа, активируемая стрессом), MAPK – мутаген-активируемая протеинкиназа, ИФ – инозитолтрифосфат, ДАГ – диацилглицерин, JAK – «Янус-киназы», STAT (от англ. Sinal Transducer and Activator of Transcription – переносчик сигнала и активатор транскрипции), Fyn, Lck – нерцепторные тирозинкиназы семейства Src, Ub – остаток убиквитина, УПБ – убиквитин-подобный белок, Ras, Rab, Rho – продукты протоонкогенов *ras*, *rab*, *rho*, участвующие в процессах роста и дифференцировки клеток, SAM – S-аденозилметионина, PARP – поли(ADP-рибозо)полимераза, VRAP – теломераза, обнаруженная в составе «vault»-частиц, GSH – глутатион, HIF – фактор, индуцируемый при гипоксии, Gla –  $\gamma$ -карбоксиглутаминовая кислота, AGE – advanced glycation end products (продукты конечного гликирования белков), CML –  $N_{\epsilon}$ -карбоксиметил-лизин, CEL – N-карбоксиэтил-лизин, HSA – человеческий сывороточный альбумин, GFP – green fluorescent protein (зеленый флуоресцирующий белок), PIMT – протеинизоаспартил-O-метилтрансфераза, DNT – дермонекротический токсин.

## ВВЕДЕНИЕ

Матричный биосинтез полипептидных цепей на рибосомах в большинстве случаев не приводит непосредственно к функционально значимому белку. Образовавшаяся полипептидная цепь должна претерпеть некоторые дополнительные химические превращения, в подавляющем большинстве случаев ферментативные, уже вне рибосомы. Так как эти превращения происходят после того, как считана информация, привнесенная матричной РНК (мРНК), т.е. закончена трансляция мРНК, то эти дополнительные процессы получили название посттрансляционной модификации.

Можно выделить две основные группы процессов посттрансляционной модификации белков. Одна из них – это протеолитические процессы, главным образом представляющие собой расщепление определенных пептидных связей, которое приводит к отщеплению части образовавшихся пептидных фрагментов. Вторая группа – это процессы, которые приводят к химической модификации боковых радикалов аминокислотных остатков, как правило, не затрагивающих полипептидного остова. Их химическая природа и функциональное значение весьма разнообразны. При этом каждый тип модификации характерен для определенных групп аминокислотных остатков. В результате этих процессов протеома клетки или организма по числу ее компонентов на порядки превосходит число генов, кодирующих белки протеомы. Настоящий обзор посвящен

именно второй группе процессов посттрансляционной модификации белков.

Существуют четыре основные группы функций белков, требующих посттрансляционной модификации боковых радикалов. Для проявления функциональной активности ряда белков необходимо наличие в их составе определенных ковалентно связанных с полипептидной цепью простетических групп, как правило, сложных органических молекул, непосредственно участвующих в проявлениях этой активности. К такому типу модификаций относится превращение каталитически неактивных апобелков в ферменты. Другая важная группа посттрансляционных модификаций обеспечивает регуляцию биохимических процессов, изменяя (в предельном случае включая или выключая) активность фермента. Еще одна большая группа модификаций вводит в белки метки, обеспечивающие определенную внутриклеточную локализацию белков, в т.ч. направление их в протеосомы для последующего переваривания. Наконец, некоторые процессы посттрансляционной модификации непосредственно или косвенно отвечают за формирование определенной пространственной структуры белка.

## МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ ПУТЕМ ПРИСОЕДИНЕНИЯ ПРОСТЕТИЧЕСКИХ ГРУПП

В некоторых случаях конечной стадией биосинтеза функционального активного белка является ковалентное присоединение простетической группы, участвующей в фор-



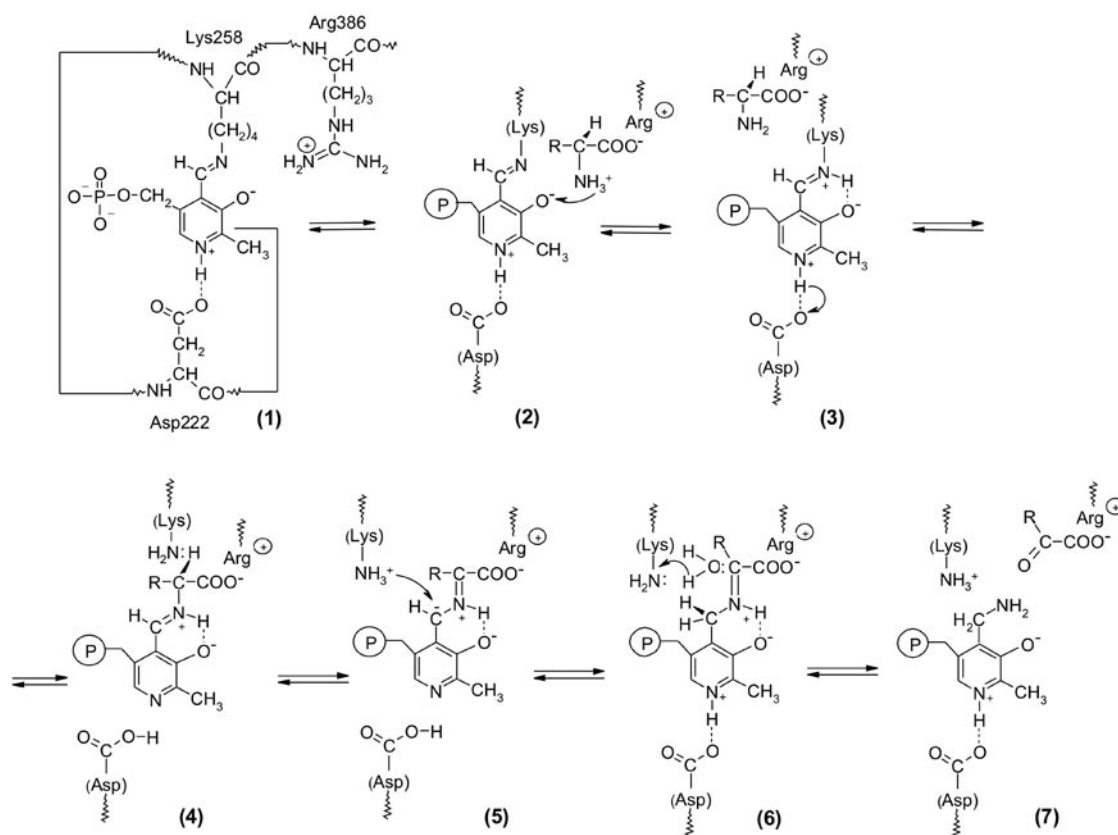


Рис. 1. Схема первой стадии реакции переаминирования, катализируемой аспарат аминотрансферазой

мировании активного центра фермента [1, 2]. В табл. 1 приведены структурные формулы продуктов модификации боковых радикалов аминокислот при ковалентном присоединении некоторых коферментов к белкам, а также тип реакций, в которых принимают участие соответствующие простетические группы.

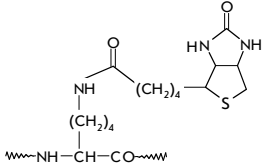
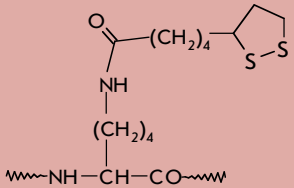
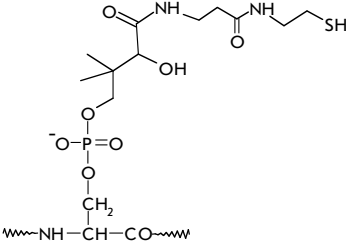
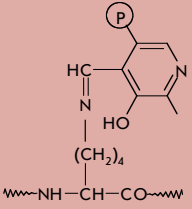
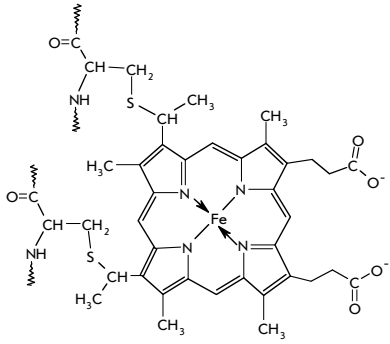
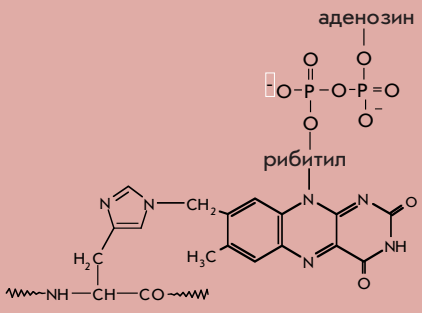
Большинство приведенных простетических групп остаются ковалентно связанными с апоферментом на протяжении всего каталитического процесса. Исключением являются лишь пиридоксальные ферменты, у которых при функционировании на определенном этапе происходит демодификация белка, а именно замена связи пиридоксальфосфата с аминогруппой лизина апофермента на связь кофермента с аминокислотой-субстратом. Динамическая модель процессов для реакций, катализируемых трансминазами, была предложена М.Я. Карпейским и В.И. Ивановым в 1969 г. [3]. Немного позднее авторами [4] была выдвинута интересная гипотеза, согласно которой фосфатная и метильная группы кофермента служат своего рода осью, вокруг которой пиридоксаль может поворачиваться, образуя или фермент-иминные или субстрат-иминные ковалентные структуры. Данные рентгеноструктурного анализа подтвердили и конкретизировали вывод о многоточечном характере связывания пиридоксальфосфата.

В качестве иллюстрации можно привести механизм действия пиридоксального фермента аспарат аминотрансферазы (К.Ф.2.6.1.1), катализирующей реакцию переаминирования между оксалоацетатом и глутаматом (рис. 1).

Кофермент в трансминазе присутствует не в виде свободного альдегида, а в виде внутреннего альдимины с боковой аминогруппой лизина (Lys-258). Связанный с ферментом имин обеспечивает более быстрый путь протекания реакции, чем свободный пиридоксальфосфат [2-4]. Именно структура определяет более высокую активность имино по сравнению с соответствующими альдегидами. Более основной азот иминов протонируется гораздо сильнее, чем кислород карбонильной группы (рис. 1, (3)). В результате переноса протона от  $\alpha$ -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-группы субстрата на атом N-альдимины пиридоксальфосфата образуются требуемые для протекания реакции катионная форма кофермента и одновременно депротонированная аминокислота (3). Кроме того, иминный углерод более электрофилен, чем карбонильный, следовательно, он легче атакуется депротонированной аминогруппой  $\alpha$ -аминокислоты (рис. 1, (4)). Увеличение электрофильности данного центра обеспечивается также через взаимодействие азота гетероцикла с остатком аспартата фермента (водородная связь с остатком Asp-222). Таким образом, промежуточный фермент-имин способствует быстрому образованию ковалентного промежуточного соединения между субстратом и коферментом.

На приведенном примере пиридоксального катализа видно, что наряду с простетической группой в каталитическом акте важную роль играет и апофермент, т.е. последний нельзя рассматривать только как носитель каталитической группы. Это, конечно, касается и других простетических групп.

Таблица 1. Основные простетические группы, участвующие в реакциях биокатализа

Название кофермента	Структура производного простетической группы	Классы ферментов. Тип реакции, в которой участвует простетическая группа
Биотин		К.Ф. 6.4.1.2; 6.4.1.3. Карбоксилазы. Карбоксилирование. Перенос одноуглеродного фрагмента в виде CO <sub>2</sub> на ацетилСоА, пропионилСоА и другие органические молекулы.
Липоат		К.Ф. 2.3.1.12. Ацилтрансферазы. Окисление-восстановление. Перенос углеродных фрагментов на СоА через восстановительное ацилирование липоамида в процессах окислительного декарбоксилирования α-кетокислот.
Пантотенат		К.Ф. 2.3.1.85. Ацилтрансферазы. Трансацелирование. Перенос ацильного фрагмента от одного фермента мультферментного комплекса к другому.
Пиридоксаль фосфат		К.Ф.2.6.1. Аминотрансферазы. Трансаминирование аминокислот.
Гем		К.Ф. 1.9.3.1. Цитохром с оксидаза. Окисление-восстановление. Перенос электронов в мембране митохондрий при окислительном фосфорилировании.
FAD		К.Ф. 1.3.99.1. Оксидоредуктазы. Окисление-восстановление. Окисление группы -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> - до транс-CH=CH-

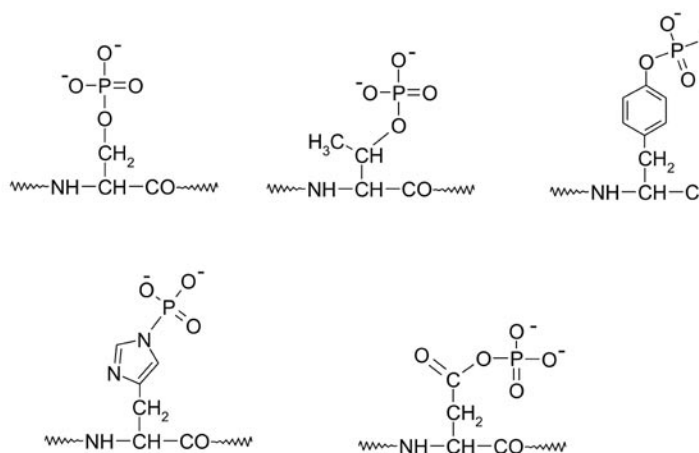


Рис. 2. Структура фосфорилированных аминокислотных фрагментов

**РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ ФОСФОРИРОВАНИЕМ**

Главную роль в осуществлении реакций, которые отвечают за перестройку всех процессов внутри клетки, приводящих, в конце концов, к ее делению или гибели, играет большая группа специальных ферментов – протеинкиназ (подкласс фосфотрансфераз, К.Ф. 2.7.), присоединяющих фосфатные группы к боковым радикалам аминокислот различных белков [5–12]. Донором фосфата во всех таких реакциях является  $\gamma$ -фосфат АТФ. Различают киназы, присоединяющие фосфат к аминокислоте тирозину (тирозинкиназы, К.Ф. 2.7.10.2) или к аминокислотам треонину и серину (серин-треонинкиназы, К.Ф. 2.7.11.1) [5]. У бактерий, растений и грибов широко распространены гистидиновые киназы, которые работают как часть двухкомпонентной системы сигнальной трансдукции [13]. Остаток неорганического фосфата, присоединенный к собственному остатку гистидина, затем переносится на остаток аспартата белка-мишени. Фосфорилирование аспартата приводит к дальнейшей передаче сигнала [13]. На рис. 2 приведены структуры продуктов фосфорилирования аминокислотных остатков в белках [1].

Согласованная регуляция взаимодействия многоклеточного организма осуществляется путем высвобождения специальных молекул (гормонов, цитокинов и т.п.), которые вызывают сигнальный каскад в клетках-мишенях. В тех случаях, когда сигнал вызывает изменение уровня экспрессии определенных генов, конечным звеном каскада оказываются факторы транскрипции [14–18]. Клетки-мишени отличают соответствующую сигнальную молекулу от множества других молекул благодаря наличию на клетке-мишени соответствующего белка-рецептора со специфическим центром связывания с сигнальной молекулой. Одни рецепторы располагаются на поверхности клеточной мембраны, другие, внутриклеточные, локализованы в цитозоле или ядре клетки. На схеме (рис. 3) представлены основные этапы передачи, например, гормональных сигналов через мембранные рецепторы, на отдельных стадиях которых активность ферментов регулируется через их модификацию путем фосфорилирования.



Рис. 3. Основные этапы передачи сигналов с помощью фосфорилирования белков. ИФ – инозитолтрифосфат, ДАГ – диацилглицерин

В структуре мембранных рецепторов можно выделить три функционально разных участка. Первый домен (домен узнавания) расположен в N-концевой части полипептидной цепи на внешней стороне клеточной мембраны; он содержит гликозилированные участки и обеспечивает узнавание и связывание сигнальной молекулы. Второй домен – трансмембранный. У рецепторов одного типа, сопряженных с G-белками, он состоит из 7 плотно упакованных  $\alpha$ -спиральных полипептидных последовательностей. У рецепторов другого типа трансмембранный домен включает только одну  $\alpha$ -спирализованную полипептидную цепь. Третий (цитоплазматический) домен создает химический сигнал в клетке, который сопрягает узнавание и связывание сигнальной молекулы с определенным внутриклеточным ответом.

Цитоплазматический участок ряда рецепторов на внутренней стороне мембраны обладает тирозинкиназной активностью. Например, связывание гормона инсулина с мембранным рецептором, который является тирозинкиназой и имеет центр фосфорилирования, инициирует ауто-

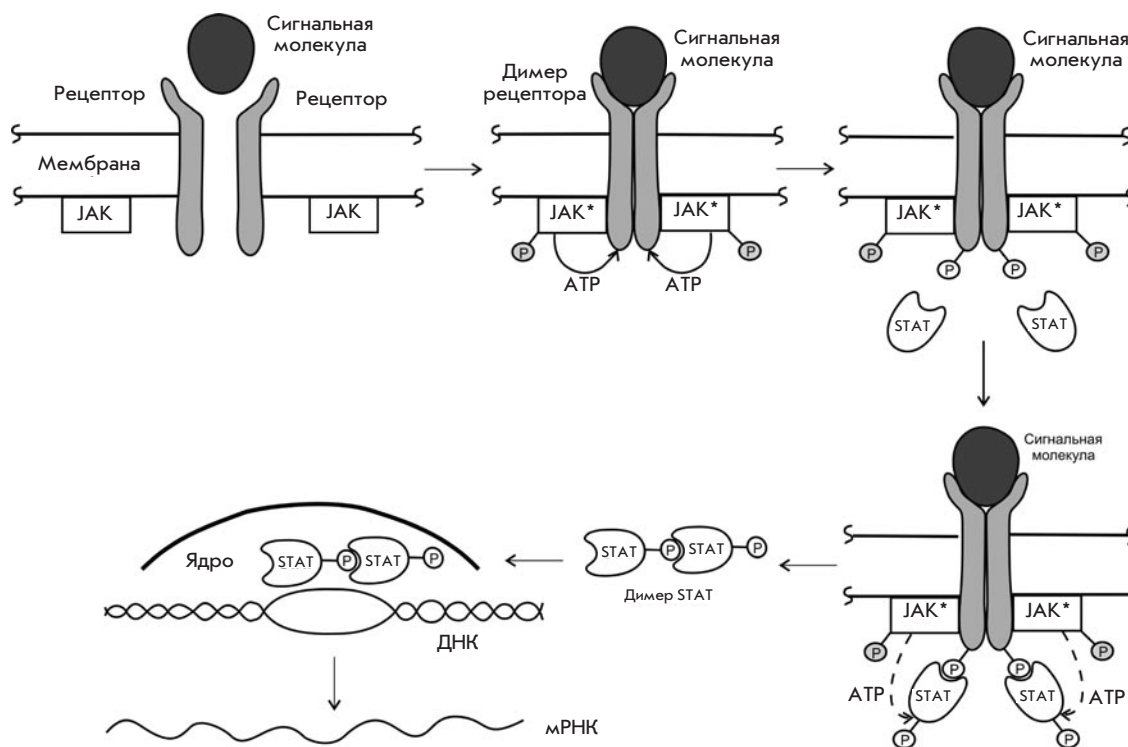


Рис. 4. Схема передачи сигнала через мембранные рецепторы, ассоциированные с JAK

фосфорилирование и последующее фосфорилирование субстратов рецептора и других белков [10]. Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) относится к семейству рецепторов фактора роста, которые связывают внеклеточные белковые лиганды и обладают также тирозинкиназными активностями [14]. После связывания лиганда рецептор димеризуется, происходит самофосфорилирование по пяти остаткам тирозина на С-конце рецептора, и белок приобретает внутриклеточную тирозинкиназную активность. Последующая активность EGFR связана с инициацией каскада сигнальной трансдукции, при которой активируются митоген-активируемые протеинкиназы, протеинкиназа B, JNK (Jun N-terminal kinase) или Stress Activated Protein Kinase (SAPK) – семейство MAP-киназ. Это приводит к синтезу ДНК и пролиферации [11, 12, 18–20].

Цитоплазматические участки других рецепторов (гормона роста, пролактина, цитокинов и др.) сами не проявляют тирозинкиназную активность, а ассоциируются с другими цитоплазматическими протеинкиназами (т.н. «Янус-киназами», или киназами семейства JAK), которые их фосфорилируют и, таким образом, активируют [11, 18]. Отличительной чертой семейства Янус-киназ среди всех тирозинкиназ млекопитающих является существование тандема киназного (JH1) и псевдокиназного (JH2) доменов. Наличие последнего и определяет название Янус-киназ, поскольку они среди всех тирозинкиназ млекопитающих имеют псевдокиназный домен, т.е. как двуликий Янус эти киназы также имеют «два лица». В псевдокиназном домене, хотя он и имеет полное сходство с киназными доменами, полностью отсутствуют остатки, отвечающие за фосфотрансферную активность. Функция данного домена, по-видимому, заключается в регуляции каталитической активности.

Связывание сигнальных молекул с рецепторами, как предполагают, приводит к запуску сигнализации посредством гомо- или гетеродимеризации субъединиц рецептора, которые устанавливаются напротив Янус-киназ, что вызывает аутофосфорилирование последних и приводит к повышению их каталитической активности. После активации Янус-киназ они фосфорилируют субъединицы рецептора по остаткам тирозина, в результате чего рецептор связывается с другими белками, например с переносчиками сигнала и активаторами транскрипции STAT (от англ. Signal Transducer and Activator of Transcription). Эти белки (STAT) затем фосфорилируются с помощью Янус-киназ, образуют димеры, транспортируются в ядро, связываясь со специфическими участками ДНК, участвуют в регуляции транскрипции (рис. 4).

Митоген-активируемые киназы (МАРК, К.Ф. 2.7.11.24) отвечают на внеклеточные стимулы (митогены) и регулируют многие клеточные процессы (экспрессию генов, деление, дифференцировку и апоптоз) [11, 17–20]. Такой сигнальный MAP-каскад консервативен для эукариот от дрожжей до млекопитающих.

Активность серин/треонин протеинкиназ регулируется несколькими событиями, например, повреждениями ДНК, а также некоторыми химическими сигналами, в т.ч. сAMP, сGMP, диацилглицеролом, Ca<sup>2+</sup> кальмодулином [5, 8, 21–24]. Данные протеинкиназы фосфорилируют остатки серина или треонина в консенсусных последовательностях, которые образуют фосфоакцепторный сайт. Эта последовательность остатков аминокислот в молекуле субстрата позволяет осуществлять контакт каталитической щели протеинкиназы с фосфорилируемой областью, что делает киназу специфичной не к какому-либо определенному

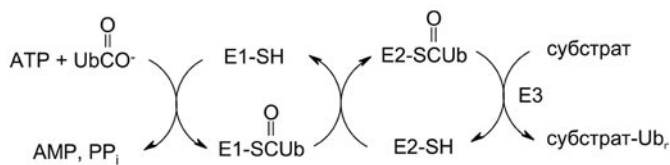


Рис. 5. Схема введения остатка (остатков) убиквитина в белок-субстрат. E1-SH – убиквитин-активирующий фермент, E2-SH – убиквитин-переносящий белок, E3 – убиквитин-протеин лигаза. Ub – остаток убиквитина

субстрату, а к специфичному семейству белков с одинаковыми консенсусными последовательностями. В то время как каталитические домены этих протеинкиназ высококонсервативны, последовательности узнавания отличаются, обуславливая узнавание разных субстратов. К протеинкиназам, регулируемым вторичными посредниками гормонального сигнала, относятся протеинкиназы A, B, C, G, кальмодулинзависимые протеинкиназы и др.

Реакция фосфорилирования может происходить не по одному положению в молекуле белка, а по множеству сайтов, при этом фосфорилированию подвергаются функциональные группы различных остатков аминокислот [25–28]. Множественное фосфорилирование характерно, например, для РНК-полимеразы II эукариот (К.Ф. 2.7.7.6) [28]. У этого фермента С-концевой домен большой субъединицы содержит большое количество (у млекопитающих 52 копии, у дрожжей – 26–27 копий) повторяющихся гептапептидных последовательностей консенсусного состава Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser. Множественное фосфорилирование этих повторов по остаткам серина и треонина способствует связыванию с ферментом большого числа транскрипционных факторов элонгации и ассоциированных с ними белков, что необходимо для перехода фермента из преиницирующего транскрипционного комплекса в устойчивый элонгирующий комплекс [29], обеспечивающий движение РНК-полимеразы по ДНК в составе хроматина.

### АЦЕТИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ

Одним из широко представленных видов посттрансляционной модификации белков, имеющих важное регуляторное значение, является ацетилирование [30–38]. Реакция проходит по ε-аминогруппам остатков лизина, донором ацильных групп является ацилкофермент А. При этом исчезает положительный заряд, что приводит к перераспределению заряда всей белковой молекулы, увеличению гидрофобности и размера боковой цепи модифицированной аминокислоты. Это, в частности, служит сигналом связывания с гистонами транскрипционных факторов и ассоциированных белков, т.е. инициации процесса транскрипции. Существенную роль в этом связывании играет наличие в ацетилируемых белках т.н. бромодомена, консервативно-модуля из 110 аминокислотных остатков [30, 31].

Процесс наиболее полно изучен на примере гистонов [32–38]. Селективное ацетилирование некоторых остатков лизина обеспечивает специфичное средство хроматина к определенным факторам транскрипции и, таким образом, предопределяет, какие гены будут экспрессироваться.

Поэтому распределение точек ацетилирования по гистонам и по их аминокислотным остаткам является важным фактором регуляции транскрипции хроматина, и обычно рассматривается один из элементов «гистонового кода», регулирующего этот процесс. В целом под «гистоновым кодом» подразумевается весь набор модификаций аминокислотных остатков в N- и С-концевых последовательностях гистонов (фосфорилирование, ацетилирование, метилирование, ADP-рибозилирование), определяющий функциональное состояние гена в отношении процессов репликации и транскрипции [33–38].

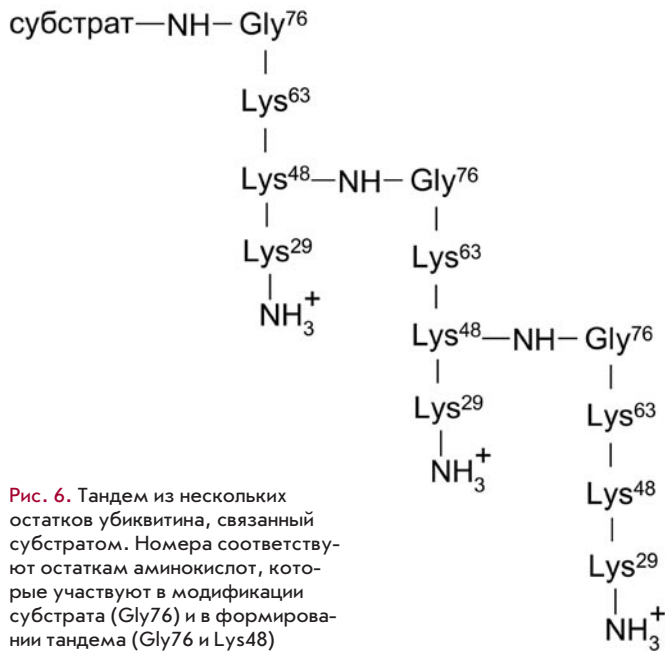
Разные формы гистон-ацетилтрансферазы (К.Ф. 2.3.1.48) катализируют ацетилирование остатков лизина, расположенных в строго специфических позициях в составе белка. Так, в октамерном ядре нуклеосомы, содержащем по две копии гистонов H2A, H2B, H3 и H4, существует 30 консервативных остатков лизина в N-концевой части белка, способных ацетилироваться (остатки в положениях 5, 9 в H2A, остатки 5, 12, 15, 20 в H2B, остатки 9, 14, 18, 23, 27 в H3, и остатки 5, 8, 12, 16) [39]. В зависимости от количества и места расположения модифицированной аминокислоты получается огромное число комбинаций распределения ацетилированных остатков, что играет важную роль в функционировании хроматина. Например, ацетилирование остатка Lys-18 в гистоне H3 дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* является основным признаком активной транскрипции хроматина – с этим модифицированным остатком связывается наибольшее количество транскрипционных факторов. Для активации транскрипции генов интерферона β в клетках человека необходимо ацетилирование Lys-8 в гистоне H4 и Lys-14 в гистоне H3 [39].

Найдено, что ацетилирование остатков лизина в С-концевых участках белков защищает белок от модификации убиквитином, увеличивая время жизни и функционирования данного белка [40].

### АЦИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ ОСТАТКАМИ ВЫСШИХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Из процессов модификации остатками высших жирных кислот чаще всего встречаются миристоилирование – введение остатка  $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{12}-\text{CO}-$  по аминогруппе N-концевого глицина [1, 41, 42] и пальмитоилирование – введение остатка  $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{CO}-$  по SH-группе остатка цистеина [1, 43, 44]. В обоих случаях ацилирование осуществляется соответствующим ацилкоферментом А, образующимся в качестве промежуточного продукта при окислительной деструкции более длинных жирных кислот.

N-концевой остаток глицина [42, 45] появляется в белке после отщепления N-концевого остатка метионина, с которого начинается трансляция. Введение миристильной группы катализируется миристоилCoA:протеин N-миристоилтрансферазой (К.Ф. 2.3.1. 97) [46, 47]. Образование амидной связи между остатками глицина и миристана является необратимым процессом. Введение остатка миристоила изменяет липофильность белковой молекулы и способствует слабому и обратимому взаимодействию белка с фосфолипидными мембранами или гидрофобными доменами других белков. Подобное взаимодействие необходимо для участия в процессах сигнализации, апоптозе, внеклеточном транспорте белков. Примерами миристили-



**Рис. 6.** Тандем из нескольких остатков убиквитина, связанный субстратом. Номера соответствуют остаткам аминокислот, которые участвуют в модификации субстрата (Gly<sup>76</sup>) и в формировании тандема (Gly<sup>76</sup> и Lys<sup>48</sup>)

рованных белков могут служить протеинкиназа A и один из основных структурных белков вируса иммунодефицита человека – GAG [45, 48]. Как правило, модификация миристиновой кислотой действует в комплексе с другими механизмами регуляции функционирования белков.

Достаточно часто вслед за модификацией миристалом по N-концевому глицину имеет место присоединение остатка пальмитиновой кислоты по остатку цистеина с образованием тиоэфирной связи [1, 43, 45, 49]. Эта модификация в отличие от миристилирования является обратимой – существуют ферментативные системы, катализирующие как пальмитирование остатков цистеина, так и их депальмитирование [50].

Результаты введения остатка пальмитиновой кислоты те же, что и при модификации глицина миристалом – увеличение липофильности белковой молекулы. Это облегчает взаимодействие с мембранами и прохождение через них, а наличие обратной реакции депальмитоилирования делает возможным участие в регуляции активности белка на различных стадиях развития клетки и проведения сигнала в клетку. Пальмитоилированию подвергаются в основном белки, участвующие в сигнализации: G-белки (малые G-белки семейства Ras, α-субъединица гетеротримерных G-белков), нерецепторные тирозинкиназы семейства Src (Fyn, Lck) [43, 45, 47, 51].

**УБИКВИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ**

Важное биологическое значение имеет ацилирование белков активированной C-концевой карбоксильной группой остатка глицина убиквитина (8 кДа), состоящего из 76 аминокислотных остатков [52–59]. Главная, хотя и не единственная функция этого процесса заключается во введении метки в белки, подлежащие уничтожению. К ним относятся различные поврежденные белки и нормальные белки, которые должны выполнять свою функцию в определенной

фазе развития клетки, и присутствие их за пределами этой фазы нежелательно.

Конъюгация белка-мишени с убиквитином включает три стадии. Первая стадия представляет собой активацию карбоксильной группы убиквитина с помощью убиквитин-активирующего фермента E1 и АТФ с образованием убиквитил-АМР. На второй стадии остаток убиквитина переносится на SH-группу убиквитин-переносящего белка E2. На третьей стадии убиквитин-протеин лигаза E3 катализирует перенос убиквитильного остатка на белковый субстрат с образованием амидной связи между C-концевым остатком глицина убиквитина G76 и остатком лизина белка-мишени (субстрата). Модифицированный остатком убиквитина белок подвергается протеолизу в протеасомах или лизосомах [57].

Если E1 представлен в клетке единственным ферментом, то фермент E2 в клетках млекопитающих имеет уже 20–40 изоформ, а для E3 фермента существуют сотни изоферментов, различающихся природой белкового субстрата. Часто для узнавания ферментом E3 необходима предварительная модификация белка-мишени различными способами: фосфорилирование (Ser/Thr, Tyr), гидроксилирование (Pro), гликозилирование (Asn), аминокислотное N-конца [54].

На молекулу белка-мишени может переноситься как один остаток убиквитина, так и несколько. На схеме (рис. 5) такой продукт обозначен как субстрат-Ub<sub>n</sub>. При полиубиквителировании субстрата фрагмент убиквитин, непосредственно связанный с белком-мишенью, ацилируется по остаткам Lys-29, Lys-48 или Lys-63 C-концевым остатком глицина следующей молекулы убиквитина [53, 60–63]. При образовании ковалентного аддукта у присоединенного фрагмента убиквитина сохраняется способность к конъюгированию вышеназванных лизинов со следующего остатком убиквитина, что, в конечном итоге, приводит к полиубиквителированию белка-субстрата (рис. 6).

Степень убиквителирования конъюгата влияет на его биологические функции. Так, для эффективной деградации белков в протеасомах необходимо тетраубиквителирование по Lys29 или Lys48 в зависимости от белка-мишени. Неправильно свернутые белки и большинство коротко живущих белков формируют тандем остатков убиквитина со связями по Lys48 [59]. Моноубиквителирование протекает в основном по многочисленным остаткам лизина в белке-мишени случайным образом. Оно, например, происходит при переходе от анафазы к метафазе во время митоза, когда необходимо «выключить» белки, участвующие в анафазе [59]. Моноубиквителирование гистона H2В человека требуется для метилирования гистона H3, что, в свою очередь, является важным для перестройки структуры хроматина и активации транскрипции «молчащих» генов [35]. Образование тандемов из нескольких остатков убиквитина по Lys63, связанных с фактором процессивности ДНК-полимеразы PCNA (ядерном антигене клеточной пролиферации), существенно для пострепликативной репарации ДНК [59, 61].

Сейчас известно несколько убиквитин-подобных белков (УПБ), которые были объединены в семейство убиквитина: сам убиквитин, Nedd8, Sumo, Fat10, ISG15, Urm1,

Рис. 7. Структуры алкилированных боковых радикалов аминокислот белка

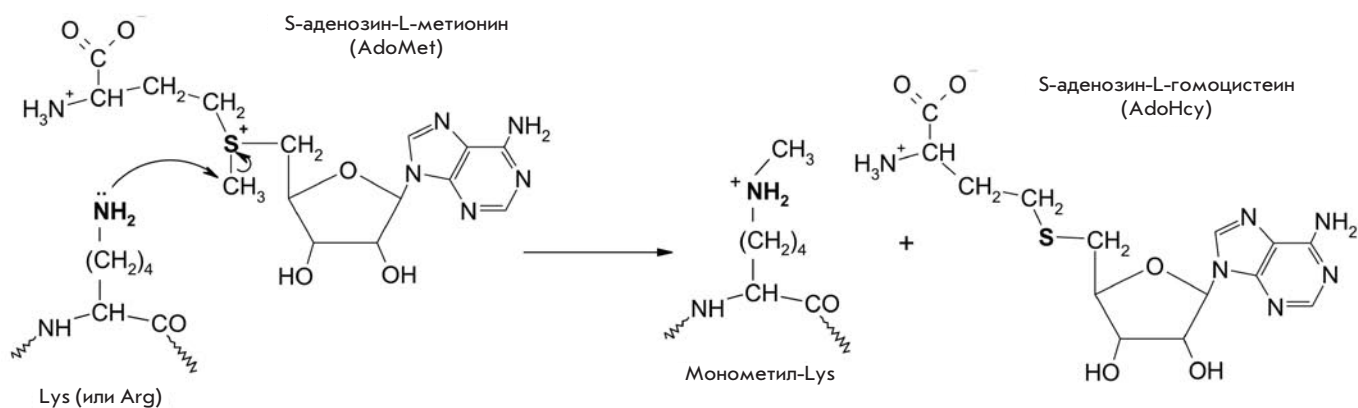
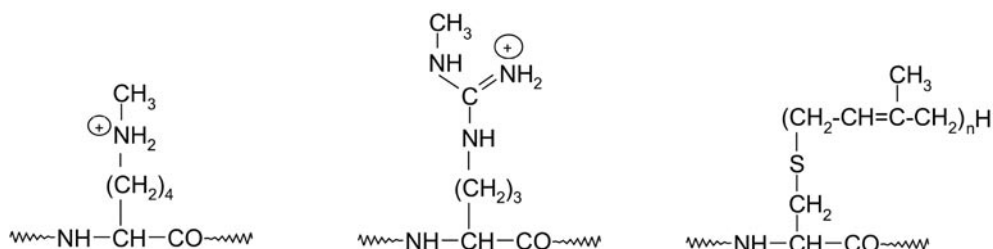


Рис. 8. Метилирование остатков лизина метилтрансферазами

Hub1 и др. [53, 56–59, 62, 64] Эти белки в разной степени гомологичны убиквитину по аминокислотной последовательности и обладают подобной пространственной структурой. Наличие в клетке большого числа УПБ отражает их включение в различные чрезвычайно разнородные процессы, протекающие в клетке. Так, Sumo участвует в транспорте веществ в ядро, в регуляции транскрипции, сегрегации хромосом; ISG15 функционирует в системе иммунного ответа; Nedd8 – в переходе клетки от мейоза к митозу; Urm1 – в росте клеток при высоких температурах [59].

Шапероны, взаимодействуя с синтезированными и не получившими правильной пространственной структуры полипептидами, выступают кофакторами ферментов убиквитилирования, т.к. содержат убиквитин-узнающий домен. После модификации белка-мишени убиквитином они эскортируют убиквитилированный белок в протеасому, где шапероны диссоциируют из комплекса, происходит высвобождение цепей убиквитина, АТФ-зависимая денатурация белка-мишени и деградация его протеазами внутри протеасомы до мелких пептидов.

### АЛКИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ

Распространенной группой посттрансляционной модификации является алкилирование. К этому типу модификации относятся метилирование по остаткам лизина и аргинина [26, 30, 33–38, 39, 65–72] и изопренилирование (введение по боковому радикалу цистеина остатков фарнезила и геранилгеранила) [47, 73–80] (рис. 7).

Метилирование белков в живых организмах происходит путем переноса  $\text{CH}_3$ -групп от *S*-аденозилметионина по реакции (рис. 8) и катализируется ферментами метилтрансферазами [1, 65, 67].

В случае лизина в реакциях, катализируемых различными метилтрансферазами, возможно образование моно-, ди-, триметиллизинов, в случае аргинина – моно- и диметиларгининов [65]. Полученные соединения отличаются размерами модифицированного остатка и степенью гидрофобности.

Метилирование белков наиболее изучено на примере модификации гистонов. Гистон-метилтрансферазы обладают высокой специфичностью по отношению к природе аминокислотного остатка (гистон-лизинметилтрансферазы (К.Ф. 2.1.1.43) и гистон-аргининметилтрансферазы (К.Ф. 2.1.1.125) и положению остатка в полипептидной цепи [1, 65]. Метилирование остатков лизина в гистонах играет важную роль в упомянутом выше «гистоновом коде» [33–36, 38]. Наиболее охарактеризованные положения метилирования в гистонах – это Lys4 и Lys9 в гистоне H3. Кроме указанных остатков, в гистоне H3 могут метилироваться выступающие над поверхностью нуклеосомы Lys27, Lys36, Arg2, Arg17 и Arg26, а в гистоне H4 – Arg3 [33, 34, 67, 70].

Было показано, что в гистоне H3 триметилированный Lys4 необходим для активации процесса транскрипции, а диметилированный Lys4 обнаружен как в активном, так и в неактивном гене [33, 34, 70]. Так, гетерохроматинный белок 1 (HP1), взаимодействуя с триметилированным Lys9 в гистоне H3 через свой хромодомен (домен, узнающий алкилированные аминокислотные остатки), вызывает

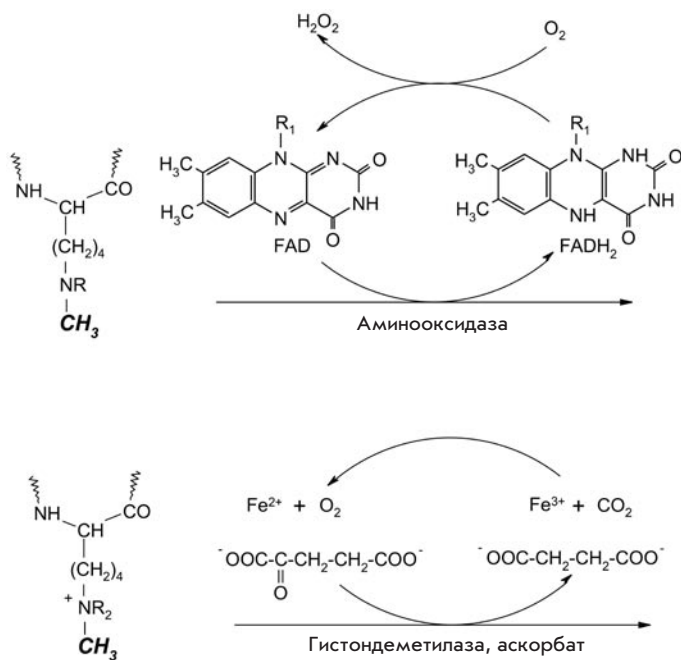


Рис. 9. Реакция деметилирования ди- и монометилованных остатков лизина в гистонах, катализируемая ФАД-зависимой аминоксидазой (вверху), и три-, ди- и монометилованных остатков лизина в гистонах, катализируемая гистондеметилазой, функционирующей в присутствии кофакторов – ионов Fe<sup>2+</sup>, α-кетоглутарата и аскорбата (внизу)

локальную конденсацию хроматина и привлекает к сборке активного транскрипционного комплекса другие белковые факторы [26, 30, 33, 67, 70].

До самого последнего времени считалось, что метилирование остатков лизина является необратимым процессом [1]. Но совсем недавно были выделены ферменты, катализирующие удаление метильных групп с остатков лизина и аргинина, т.е. установлено, что и эта посттрансляционная модификация является динамичной. Деметилирование лизина является окислительным процессом и может катализоваться или ФАД-зависимой полиаминоксидазой, или лизин-специфичной деметилазой, функционирующей как диоксигеназа в присутствии кофакторов – ионов Fe<sup>2+</sup>, α-кетоглутарата и аскорбата (К.Ф. 1.5.3.4) [37, 65, 66, 82, 83]. Схема процесса приведена на рис. 9.

Деметилирование остатка модифицированного аргинина осуществляет ядерная пептидиларгинин деиминаза (К.Ф. 3.5.3.15), превращающая метилированный аргинин в цитруллин [66] (рис. 10).

Таким образом, метилирование-деметилирование наряду с ацетилированием-деацетилированием определенных аминокислотных остатков в гистонах является одним из основных факторов регуляции активации или репрессии генов.

### ИЗОПРЕНИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ

Некоторые случаи посттрансляционной модификации представляют собой введение по функциональной группе цистеина остатков изопреноидов – олигомеров, построенных из остатков изопрена – фарнезила и геранилгеранила (рис. 11). Модификация белков этими радикалами катализируется соответственно протенифарнезил- и протенигеранилгеранил трансферазами, соответственно К.Ф. 2.5.1.58 и К.Ф. 2.5.1.59 или К.Ф. 2.5.1.60 (геранилгеранилтрансферазы

I и II типа). Ферменты I типа катализируют перенос геранилгеранильного остатка на остаток цистеина в С-концевой последовательности белка Cys-A-A-X, а II типа – на последовательности Cys-Cys-X-X, X-X-Cys-Cys или X-Cys-X-Cys [47, 73–80], где А – остаток небольшой алифатической аминокислоты, X – различные аминокислоты.

Изопренилированию подвергаются белки семейств Ras, Rab, Rho (продукты протоонкогенов *ras*, *rab*, *rho*, участвующие в процессах роста и дифференцировки клеток), центромерные белки, γ-субъединицы гетеротримерных G-белков, шапероны, тирозинфосфатазы [47, 73, 75, 78, 79, 81]. В С-концевой последовательности белков семейства Ras обнаружен мотив Cys-A-A-X, где X – аминокислотный остаток, определяющий специфичность фермента: Leu, Phe, Met – в случае геранилгеранилтрансферазы I типа; Ala, Gln, Ser, Met, Phe – в случае фарнезилтрансферазы [47, 74, 78, 79]. Ферменты, переносящие изопренильные остатки, являются металлоэнзимами, содержащими один ион Zn<sup>2+</sup> на димерную молекулу фермента. Ион цинка активирует тиольную группу цистеина для нуклеофильной атаки изопренильной группы [73]. Введением изопренильной

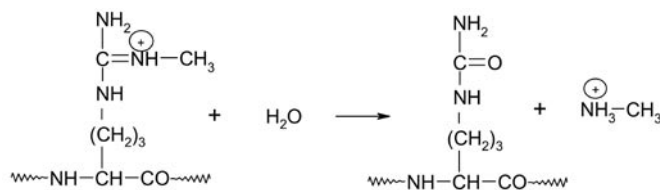
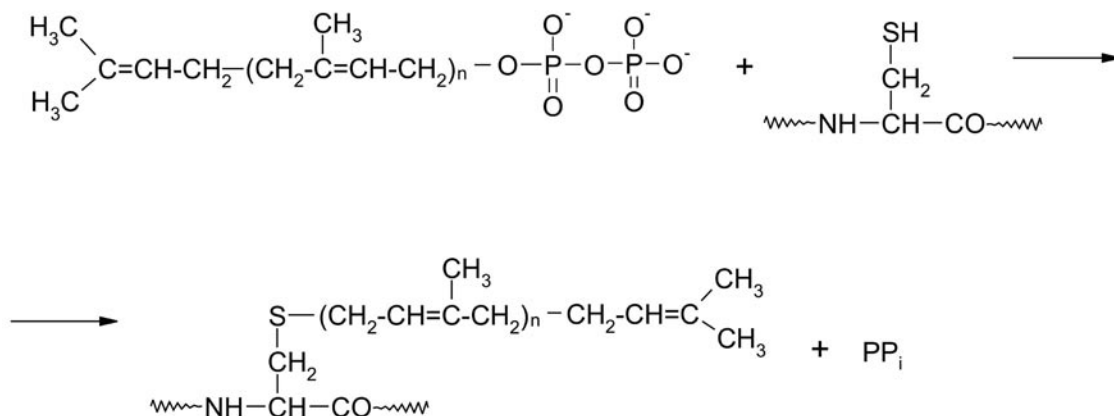


Рис. 10. Реакция деметилирования модифицированных остатков аргинина, катализируемая ядерной пептидиларгинин деиминазой (PAD4) [58]



Рис. 11. Реакция переноса остатка изопреноида от пирофосфата на остаток цистеина апобелка. n = 2 – остаток фарнезила, n = 3 – остаток геранилгеранила



группы по остатку цистеина в мотиве Cys-A-A-X, как правило, не заканчивается модификация белка-мишени (Ras, Rho), а наблюдается дальнейший процессинг: протеолитическое удаление Cys-A-A-X-протеазой трипептида A-A-X с C-конца и карбоксиметилирование остатка изопренилцистеина ферментом изопренилцистеинкарбоксиметилтрансферазой (К.Ф. 2.1.1.100) [84–87] (рис. 12).

В случае GTPаз семейства Rab, вблизи C-конца обнаружен мотив Cys-Cys-X-X, оба цистеиновых остатка которого могут подвергаться дальнейшей модификации остатками геранилгеранила с помощью протеин-геранилгеранилтрансферазы II типа, что вводит в молекулу белка два липидных якоря [74, 75]. Такой белок, обладая большим сродством к липидным мембранам, служит уникальным местом опознавания для определенных белок-белковых взаимодействий.

Белки семейства Rab участвуют во внутриклеточном везикулярном транспорте, циркулируя между мембраной клетки и цитозолем. Обратимая ассоциация белка с клеточной мембраной в строго определенном месте осуществляется как раз за счет изопренильных остатков, введенных в эти белки [75, 84].

Поскольку 20–30 % случаев онкологических заболеваний человека связано с мутациями белков семейства Ras, ферменты, модифицирующие эти белки изопренильными остатками, могут служить мишенями для противоопухолевых препаратов [73, 79].

### ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ

Важную роль для функционирования эукариот играет процесс гликозилирования белков, который протекает по OH-группам остатков серина или треонина (O-гликозилирование) и функциональной группе бокового радикала аспарагина (N-гликозилирование) (рис. 13).

N-гликозилирование белков происходит по карбоксимидному атому азота остатка аспарагина в последовательности Asn-X-Ser/Thr. Образование N-гликозидов начинается в эндоплазматическом ретикулуме с катализируемого олигосахарилтрансферазой (К.Ф. 2.4.1.119) переноса на белок разветвленного тетрадекасахаридного фрагмента (Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>(GlcNAc)<sub>2</sub>), донором которого служит углеводсодержащий долихолпирофосфат.

Огромное многообразие гликопротеинов обеспечивается последующим процессингом связанного с белком тетра-

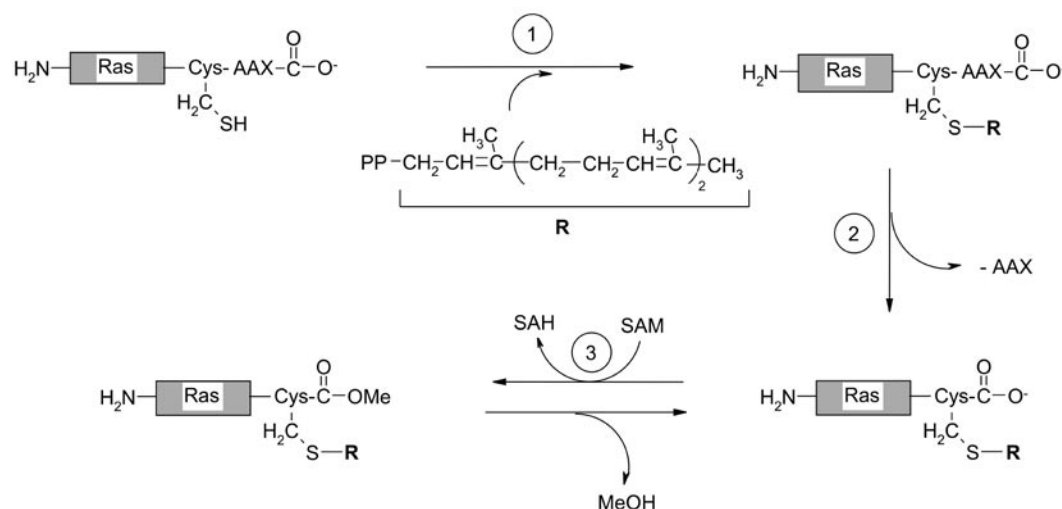


Рис. 12. Изопренилирование белка Ras: 1 – введение остатка фарнезила по остатку цистеина в последовательности Cys-A-A-X (A – небольшой алифатический аминокислотный остаток, а X – Leu, Phe, Met); 2 – удаление трипептида A-A-X с помощью Ras-конвертирующего фермента, представляющего собой CysAAX-эндопептидазу; 3 – карбоксиметилирование остатка изопренилцистеина с помощью изопренилцистеинкарбоксиметилтрансферазы [86]

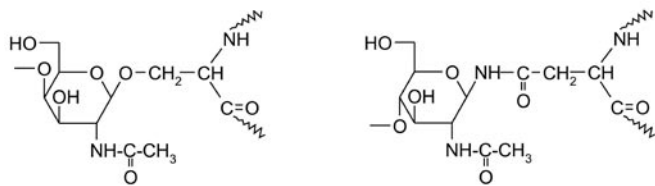


Рис. 13. Структуры продуктов присоединения *N*-ацетилглюкозамина по боковым радикалам серина и аспарагина белков

декасахаридного остатка, который обусловлен действием ряда гликозидаз и гликозилтрансфераз.

На рис. 15 представлена структура связанного тетрадекасахарида и продуктов первых стадий процессинга, катализируемого гликозидазами I и II (К.Ф. 3.2.1.106), приводящими к отщеплению двух остатков глюкозы, и маннозидазами (К.Ф. 3.2.1.130), приводящими к отщеплению шести остатков маннозы. Образовавшийся после удаления двух остатков глюкозы гликопротеин, содержащий *N*-связанный додекасахаридный остаток, служит местом опознавания белками-шаперонами: калнексином и калретигулином, помогающими гликопротеину принять правильную пространственную структуру во время его перемещения от места синтеза на мембрансвязанных рибосомах во внутреннюю часть эндоплазматического ретикулума [1, 88, 89, 90–93]. После отщепления третьего остатка глюкозы гликозидазой эндоплазматического ретикулума шапероны теряют сродство к ундекасахариду и диссоциируют из комплекса с гликопротеином. UDP-глюкоза:гликопротеин гликозилтрансфераза (К.Ф. 2.7.8.19) переносит назад остаток глюкозы на ундекасахарид, что заставляет калнексин и калретигулин вступить в следующий этап рефолдинга гликопротеина. Таким образом, осуществляется контроль за поддержанием функционально значимой структурной организации секретируемых гликопротеинов.

Если гликопротеин не будет свернут правильным образом в течение нескольких циклов дегликозилирования-регликозилирования, он переносится в цитозоль, где подвергается полиубиквитилированию с помощью E3-лигазы, являющейся составной частью системы деградации неправильно свернутых белков в эндоплазматическом ретикулуме, и гидролизует в протеосомах [1, 88, 89, 90–94].

Правильно свернутый  $\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2\text{N}$ -гликопротеин с помощью маннозидаз эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи теряет шесть остатков маннозы с образованием связанного с белком корового пентасахарида  $\text{Man}_3(\text{GlcNAc})_2$ . Последний может присоединять с помощью различных гликозилтрансфераз, разнообразие которых характерно для эндоплазматического ретикулума и аппа-

рата Гольджи, всевозможные моносахариды, в результате чего число различных гликопротеинов измеряется десятками тысяч [1, 88, 89, 95].

*O*-гликозидные цепи в гликопротеинах гораздо короче и проще, чем *N*-гликозидные. Многие белки, включая транскрипционные факторы, белки ядерных пор, онкопротеины, содержат моносахаридный остаток *N*-ацетилглюкозамина, который вводится в белок с помощью *O*-GlcNAc-трансферазы (К.Ф. 2.4.1.94) и отщепляется соответствующей гидролазой [1, 88, 89, 96, 97–100]. Встречаются и *O*-гликозиды, содержащие ди-, три- или тетрагликозидный фрагмент.

Короткие *O*-гликозидные цепи в *O*-гликопротеинах, важные для проявления транскрипционной активности, могут служить элементом узнавания при взаимодействии с мембранными клеточными рецепторами, принимающими участие в проведении сигнала в клетку [1, 88, 89, 100–102].

### СУЛЬФИРОВАНИЕ БЕЛКОВ

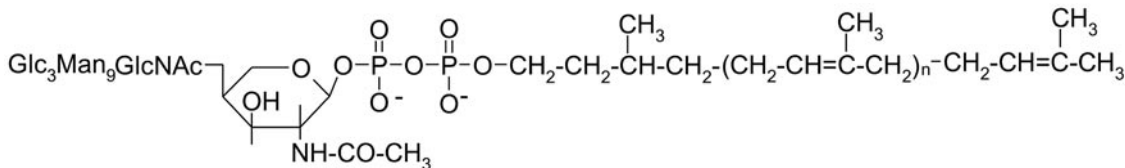
Еще одной посттрансляционной модификацией белков является введение остатка сульфата по OH-группам тирозина. Донором сульфата является фосфоаденозил-фосфо-сульфат (рис. 16). Реакция катализируется сульфотрансферазой (К.Ф. 2.8.2.20) [103, 104].

Так, например, в *N*-концевой части мембранного клеточного рецептора хемокина человека (регулятора противовоспалительных иммунных реакций), имеющего большое значение для эмбрионального развития и иммунного ответа, три остатка тирозина Tyr7, Tyr12, Tyr21 подвергаются посттрансляционному сульфированию в аппарате Гольджи, что увеличивает сродство рецептора к своему лиганду – хемокину SDF-1 $\alpha$ . Соответственно в лизосомах обнаружены ферменты, катализирующие гидролиз сульфозэфиров – сульфатазы (К.Ф. 3.1.5.6) [103, 105, 106].

### МОНО- И ПОЛИ(ADP-РИБОЗИЛ)ИРОВАНИЕ

Во многих клеточных процессах, таких как репарация ДНК, апоптоз и функции веретена при делении клетки, обратимое моно- и поли(ADP-рибозил)ирование белков используется в качестве важного механизма регуляции [107]. Многие патогенные бактерии секретируют токсины, которые ADP-рибозилируют белки человека, вызывая различные тяжелые болезни: холеру, дифтерию, коклюш, ботулизм [108–111].

Донором ADP-рибозильного остатка является  $\text{NAD}^+$ . Положительно заряженная никотинамидная группа отщепляется под действием ADP-рибозилтрансферазы (К.Ф. 2.4.2.31) и образуется рибооксокарбеновый катион, который, взаимодействуя с различными нуклеофильными группами в активных центрах белков, приводит к их (ADP-рибозил)ированию (рис. 17) [108, 109].



$n = 9 - 22$

Рис. 14. Структура углеводсодержащего долихолпирофосфата

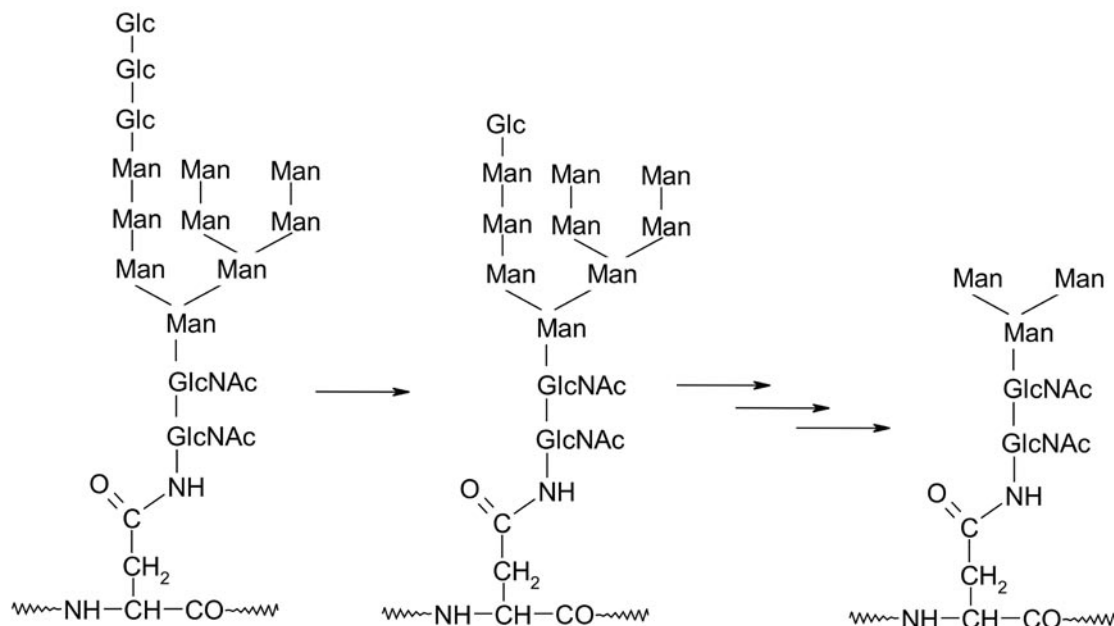


Рис. 15. Структура и первые стадии процессинга олигосахаридного фрагмента  $\text{Glc}_3\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$  в составе гликопротеина. Моносахариды Glc – глюкоза, GlcNAc – *N*-ацетилглюкозамин, Man – манноза

Так, например, коклюшный токсин переносит образовавшийся катион на тиолатную цепь остатка цистеина в активном центре  $\alpha$ -субъединицы  $G_i$ -белка человека, регулирующего образование вторичного посредника cAMP [1, 111, 112]. Холерный токсин осуществляет перенос остатка ADP-рибозила на гуанидиниевую группу остатка аргинина  $\alpha$ -субъединицы  $G_s$ -белка человека ([1, 111, 113]. ADP-рибозильный остаток может переноситься С3 токсином *Clostridium botulinum* на нуклеофильный остаток Asn41 малой ГТРаза суперсемейства белков Rho человека, что приводит к деполимеризации актина

и нарушению обменных процессов в хозяйской клетке [1, 111].

Дифтерийный токсин ADP-рибозилирует His715 в структуре фактора элонгации eEF-2, блокируя транслокацию пептидов на рибосомах, а значит и весь процесс трансляции белка в клетке человека [114].

В действительности His715 подвергается сложной модификации: сначала происходят перенос от *S*-аденозилметионина (SAM) аминокарбоксипропильного остатка, далее SAM-зависимое *N,N,N*-триметилирование, глутамин-опосредованное амидирование карбоксильной

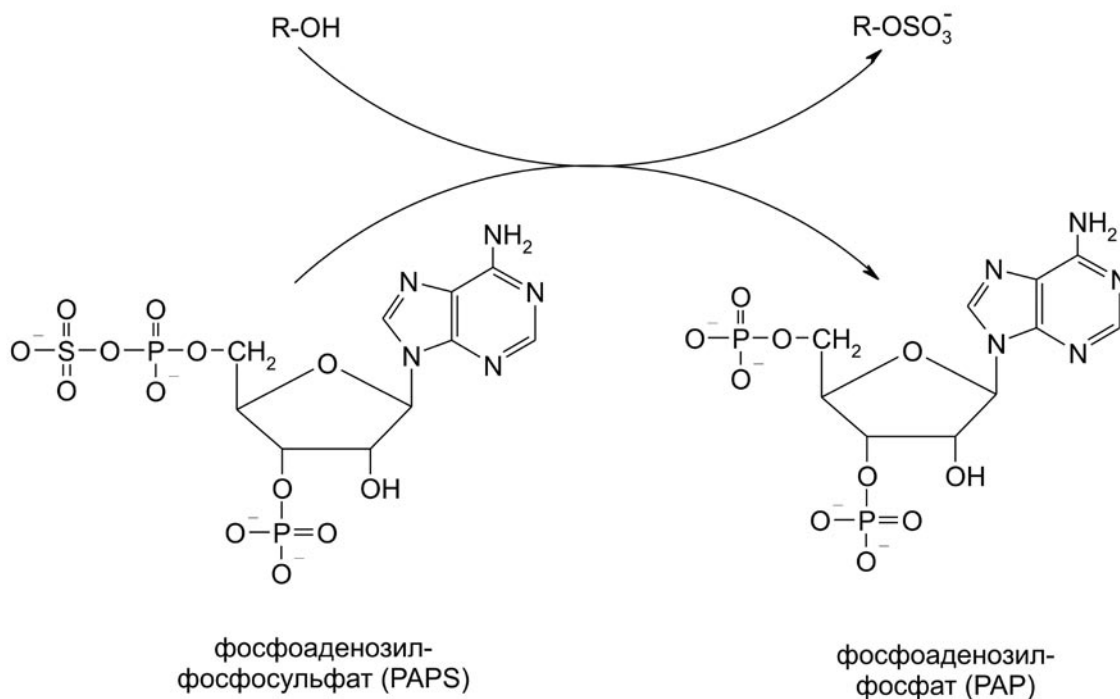


Рис. 16. Реакция сульфирования, катализируемая сульфотрансферазой

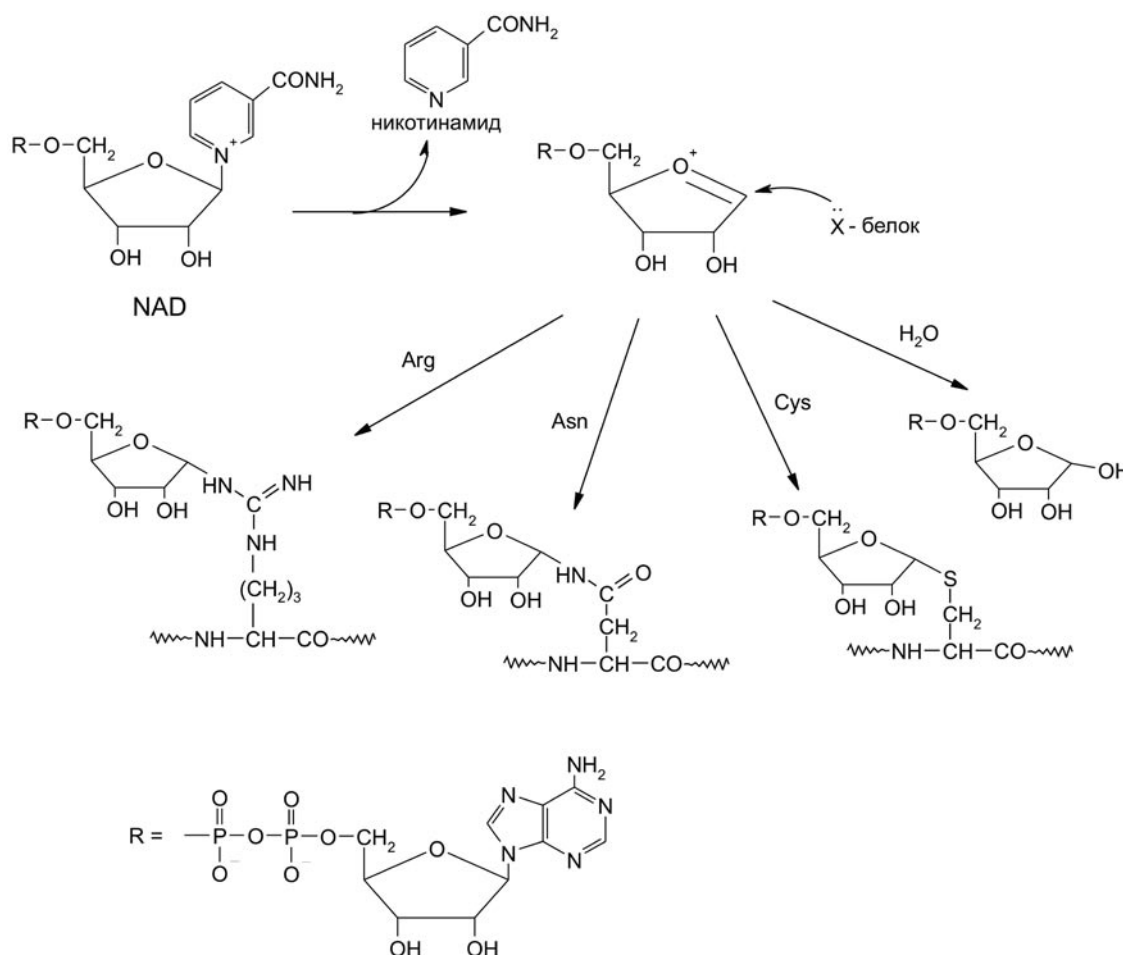


Рис. 17. (ADP-рибозил)ирование нуклеофильных аминокислотных остатков (X) в составе белка: цистеина, аргинина, аспарагина [1]

группы с образованием дифтаמידного остатка, а затем только токсин ADP-рибозилирует дифтаמידный остаток по N3 имидазольного кольца (рис. 18) [115–117].

В процессе жизнедеятельности организма геном постоянно подвергается воздействию генотоксических агентов, как экзогенного, так и эндогенного происхождения [118]. Ориентировочная оценка выявила, что в течение дня в геноме клеток человека возникает до 104–106 повреждений [119]. В этих условиях сохранение целостности генома клетки является одним из наиболее важных факторов, обеспечивающих выживание многоклеточного организма, поскольку неисправленные повреждения в ДНК могут способствовать развитию мутаторного фенотипа клетки [120]. Синтез поли(ADP-рибозы) (PAR) является одной из незамедлительных реакций в эукариотической клетке в ответ на образование разрывов ДНК под действием ионизирующей радиации, алкилирующих или окисляющих реагентов [121, 122]. Данный процесс катализируют ферменты – поли(ADP-рибозо)полимеразы (PARPs), которые постоянно и в большом количестве экспрессируются в клетке [123]. При образовании разрывов ДНК PARPs активируются и осуществляют посттрансляционную модификацию ряда ДНК-связывающих белков за счет ковалентного присоединения полимера – поли(ADP-рибозы) к карбоксильной

группе аминокислотных остатков глутаминовой и аспарагиновой кислоты в составе белка-акцептора [124]. На сегодняшний день идентифицировано порядка 30 ядерных белков, которые поли(ADP-рибозил)ируются *in vivo* и *in vitro* [123, 125]. Все эти белки обладают ДНК-связывающей активностью и участвуют в метаболизме ДНК (репликация, транскрипция, репарация) или в формировании структуры хроматина (гистоны). В клетках эукариот идентифицировано несколько ферментов класса поли(ADP-рибозо)полимеразы, в т.ч. PARP1, PARP2 и PARP3, присутствующие в ядре, танкиразы 1 и 2, которые взаимодействуют с теломерными белками и, вероятно, участвуют в регуляции теломерных функций, VRAP (193 кДа), обнаруженная в цитоплазматических, рибонуклеопротеидных “vault”-частицах [126], sPARP – укороченная форма PARP1, для активации которой не требуется разрывов ДНК [127], макро PARPs (BAL/PARP-9, PARP14, PARP15), связанные с эпигенетической модификацией хроматина [124, 128]. Синтез поли(ADP-рибозы) в ядре практически на 90 % обусловлен активностью PARP1 [129]. Уровень экспрессии этого белка не меняется на протяжении клеточного цикла, и на одну клетку приходится порядка  $1.0 \cdot 10^6$  молекул этого белка, что соответствует одной молекуле белка на 6000 пар нуклеотидных оснований [130]. Каталитически неактивный

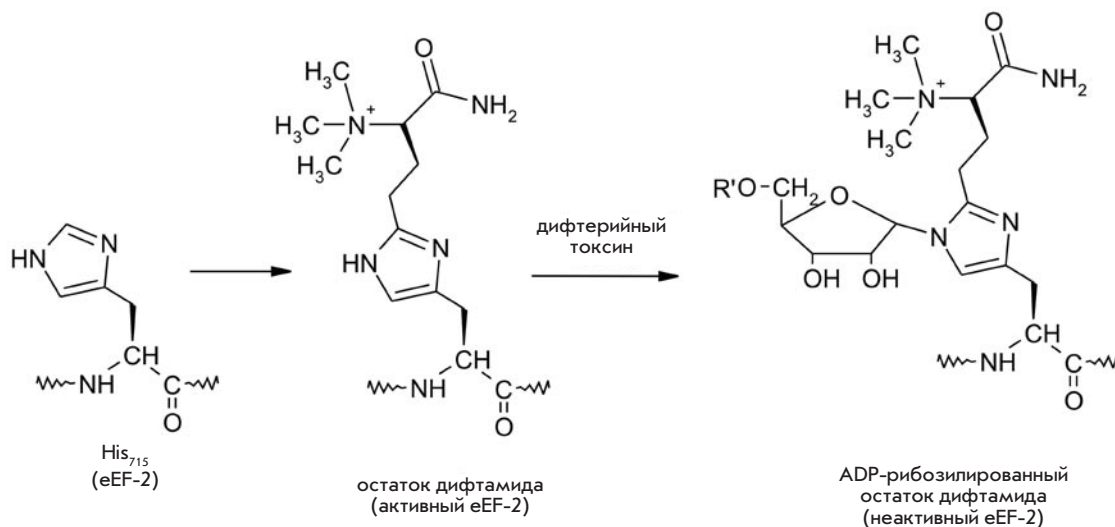


Рис. 18. Модификация His715 в структуре фактора элонгации eEF-2 человека, приводящая к блокированию синтеза белка в клетках человека

PARP1 находится в нуклеоплазме и при появлении разрыва в ДНК связывается с областью повреждения и катализирует синтез PAR [128]. Синтез поли(ADP)-рибозы PARP1 осуществляется в три стадии: инициация, элонгация и разветвление полимера (рис. 19).

На первой стадии образуется сложноэфирная связь между ADP-рибозой и карбоксильной группой остатка глутамата в белке-акцепторе [131, 132]. На второй стадии за счет образования O-гликозидной связи между C2' и C1'' атомами молекул ADP-рибозы синтезируется линейная цепь полимера [133, 134]; на третьей стадии за счет образования гликозидной связи между C2'' и C1''' атомами ADP-рибозы происходит формирование разветвлений в структуре полимера [135, 136] (рис. 19).

В процессе синтеза поли(ADP-рибозы) скорость реакции на стадии моно(ADP-рибозил)ирования примерно в 200 раз ниже, чем на стадии элонгации цепи [137]. На основании измерения кинетических параметров реакции поли(ADP-рибозил)ирования PARP *in vitro* авторы [138] предположили, что данная реакция является межмолекулярной, т.е. на сайте разрыва ДНК PARP1 функционирует как гомодимер. С разрывом ДНК взаимодействует сразу две молекулы PARP1, и в процессе реакции обе молекулы одновременно осуществляют синтез поли(ADP-рибозы) и выступают в роли ее акцептора. Ковалентная модификация PARP1 за счет присоединения отрицательно заряженной поли(ADP-рибозы) приводит к изменению физико-химических свойств данного белка и диссоциации ее комплекса с ДНК [139]. Таким образом, через самомодификацию может осуществляться регуляция ДНК-связывающей активности PARP1 [140].

Обнаружение поли(ADP-рибозил)ирования белков, обеспечивающих конденсацию и релаксацию хроматина, гистонов *in vivo* и топоизомеразы *in vitro*, предполагает участие PARP1 в модуляции структуры хроматина при репарации ДНК [123, 133, 141]. Было показано, что кинетические параметры процесса репарации ДНК зависят от присутствия гистонов на поврежденной ДНК [123].

При повреждении ДНК поли(ADP-рибозил)ирование *in vivo* гистона H1 и гистонов, образующих нуклеосомный кор, может играть важную роль в ходе репарации ДНК, особенно когда она структурирована в виде хроматина, поскольку модификация гистонов может приводить к их диссоциации с ДНК, обеспечивая доступ ферментов репарации к сайту повреждения [123, 140].

Таким образом, к настоящему времени сложилось представление о том, что клеточный ответ на повреждение ДНК может модулироваться за счет функциональной активности PARP1. С одной стороны, PARP1 активирует репарационные процессы, тем самым способствуя выживанию клетки, с другой стороны, когда повреждение ДНК невозможно восстановить и имеется высокая вероятность появления мутаторного фенотипа, «сверхактивация» PARP1 индуцирует гибель клетки [142]. Поэтому синтез поли(ADP-рибозы), катализируемый PARP1 в процессе взаимодействия с разрывами в ДНК, можно рассматривать как сигнал об уровне повреждения в ДНК для определения дальнейшей стратегии функционирования клетки.

### ОКИСЛЕНИЕ СУЛЬФИДРИЛЬНОЙ ГРУППЫ ОСТАТКА ЦИСТЕИНА БЕЛКОВ

Для большого числа белков характерно образование дисульфидных связей в результате реакции между остатками цистеинов как внутри одной полипептидной цепи, так и между разными полипептидными цепями; в этом случае они выполняют структурную роль и служат для поддержания третичной и четвертичной структур белка, что необходимо для участия белка в метаболических реакциях, протекающих в организме. Эта модификация также существенна для регуляции окислительно-восстановительного статуса клетки, что влияет на многие аспекты клеточного гомеостаза, регулируя ряд клеточных процессов, таких как пролиферация, дифференцировка и апоптоз, путем изменения функций белков с помощью обратимой модификации остатков цистеина [143–147].

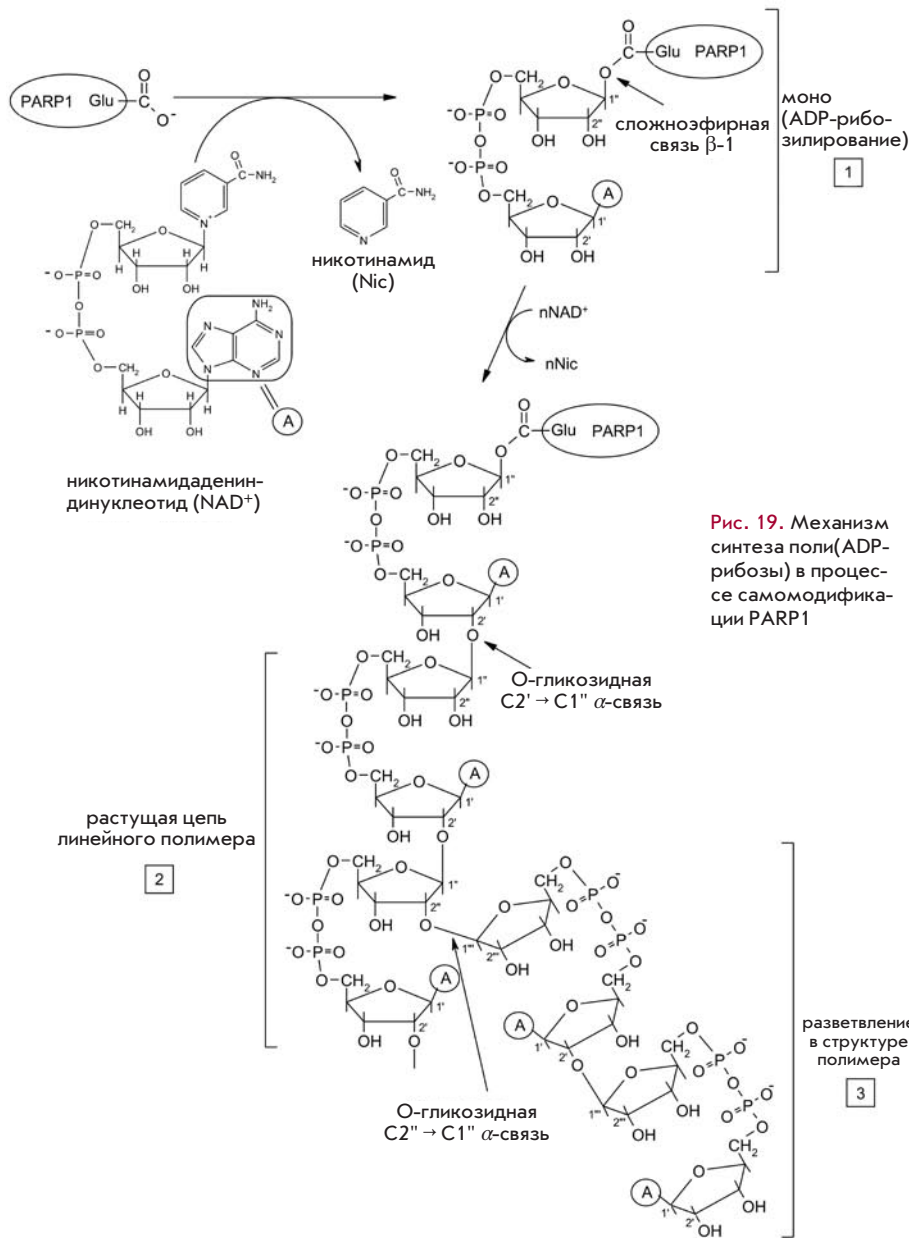


Рис. 19. Механизм синтеза поли(ADP-рибозы) в процессе самомодификации PARP1

Окисление остатков цистеина включает следующие процессы: формирование дисульфидной связи, образование сульфи- и сульфокислот, связывание глутатиона [145]. Образование дисульфидной связи происходит через окисление электрон-богатой сульфгидрильной группы (или тиолатного аниона, образующегося из нее при диссоциации протона) боковой цепи остатка цистеина. Одноэлектронное окисление сульфгидрильной группы приводит к образованию радикала тиола, который может димеризоваться с образованием дисульфида [147].

В физиологических условиях в клетке большинство сульфгидрильных групп существует в окисленной форме в виде дисульфидных связей. Восстановление дисульфидной связи в клетке осуществляется с помощью трипептида глутатиона γ-Glu-Cys-Gly (GSH), который при этом превращается в окисленный глутатион (GSSG). При высоких уровнях NAD(P)H и ферментов глутатионредуктазы (К.Ф. 1.8.1.7) и тиоредоксинредуктазы (К.Ф. 1.8.1.9) происходит восстановление окисленного глутатиона [143–147] (рис. 20). При прохождении белков по секреторным путям эукариотической клетки происходит уменьшение уровня глутатиона и NAD(P)H, поэтому белки находятся предпочтительно в структурах, стабилизированных дисульфидными связями [148].

Окислители (пероксид водорода, гидроксильный радикал) могут окислять сульфгидрильную группу цистеина в цистеинсульфеновую кислоту (-SOH) [147]. Взаимодействие остатка цистеинсульфеновой кислоты с ближайшим остатком Cys-S- также приводит к образованию дисульфидной связи.

Восстановление дисульфидной связи может происходить и путем тиол-дисульфидного обмена с глутатионом или тиоредоксином (TSH), низкомолекулярным (12 кДа) белком, содержащим в активном центре каталитически активные сульфгидрильные группы: Cys-Gly-Pro-Cys – и играющим центральную роль в контроле окислительно-восстановительного статуса дисульфидных связей в белках, что регулирует ряд клеточных процессов. Окисленные формы последних соединений восстанавливаются NAD(P)H и глутатионредуктазой / тиоредоксинредуктазой [146–149].

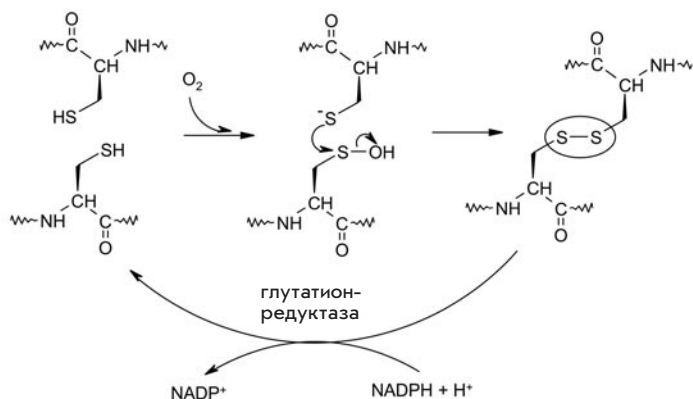


Рис. 20. Окисление сульфгидрильной группы остатка цистеина с образованием дисульфидной связи, которая может восстанавливаться обратно в тиольную группу с помощью NAD(P)H и глутатионредуктазы [147]

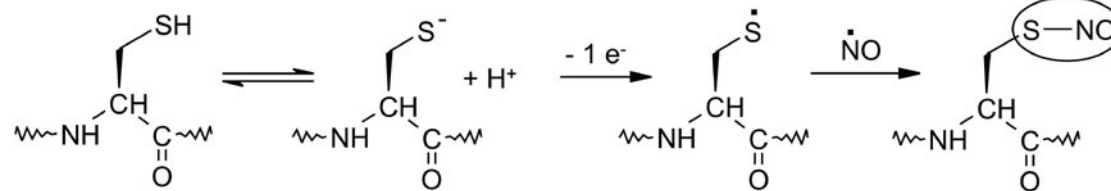


Рис. 21. Окисление тиолатного аниона в присутствии оксида азота с образованием цистеинилнитроксида [154]

Как тиолатный анион, так и тиильный радикал способны взаимодействовать с другими окислителями и радикалами (например, NO<sup>•</sup>) (рис. 21).

Образующееся соединение CysSNO участвует в окислительной сигнализации в клетке [150–154].

### ГИДРОКСИЛИРОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ГРУПП БЕЛКОВ

Одним из видов пост-трансляционной модификации является окислительная реакция гидроксилирования. Реакция происходит по остаткам аминокислот, не являющимся нуклеофилами: СН<sub>2</sub>-группам пролина, лизина и аспарагина с образованием соответственно 3-гидроксипролина, 4-гидроксипролина, 5-гидроксилизина и 3-гидроксиаспарагина и катализируется железосодержащими монооксигеназами подподкласса К.Ф. 1.14.16 [155, 156, 157] (рис. 22).

Окисленные остатки пролина и лизина играют важную роль в образовании водородных связей в трехнитевой пространственной структуре белка соединительной ткани коллагена. Окисление происходит в последовательностях Pro-Gly и Lys-Gly. 4-гидроксипролин встречается на порядок чаще, чем 3-гидроксипролин [155–160].

Помимо этого гидроксилирование определенных аминокислотных остатков играет роль в функционировании индуцированного гипоксией транскрипционного фактора HIF (hypoxia inducible factor) [156, 159–161]. Этот белок активируется в условиях недостатка кислорода. Он индуцирует транскрипцию большого количества генов, в т.ч. гена, кодирующего белок эритропоэтин, стимулирующий образование эритроцитов из клеток-предшественников, усиливая перенос кислорода к клеткам, страдающим от гипоксии [160].

α-Субъединица гетеродимера HIFαβ человека пост-трансляционно гидроксилируется в центральной части

молекулы по двум остаткам пролина: Pro402 и Pro564 с образованием 4-ОН-Pro и в С-концевой части – по Asn803 с образованием 3-ОН-Asn [156]. Фактор, содержащий гидроксильные остатки пролина, подвергается убиквитилированию с помощью E3-лигазы, и время жизни HIF определяется скоростью гидроксилирования, убиквитилирования и протеолиза в протеасомах. При низком давлении O<sub>2</sub> реакция гидроксилирования пролина протекает медленно. При высоком давлении кислорода Pro-гидроксилаза достаточно быстро гидроксилирует остатки Pro, что приводит к увеличению сродства к E3-лигазе в 1000 раз, быстрому убиквитилированию и разрушению в протеасомах, при низком давлении кислорода HIF достаточно устойчив и существует долгое время [162, 163].

Реакция гидроксилирования боковых цепей пролина и аспарагина катализируется семейством монооксигеназ, содержащих негемовое железо [163]. В активном центре фермента (рис. 23) содержится два остатка гистидина и один остаток аспартата, занимающие три из шести координационных мест вокруг иона Fe<sup>2+</sup>, два места заняты косубстратом α-кетоглутаратом и шестое место – кислородом. Взаимодействие α-кетоглутарата и кислорода приводит к окислительному декарбокислированию до CO<sub>2</sub> и сукцината, в который внедряется один из атомов молекулярного кислорода. Второй атом кислорода участвует в генерировании высоковалентного комплекса Fe<sup>4+</sup>=O. Последнее соединение является эффективным окислителем, разрывающим неактивированную C–H связь при C3 или C4 пролина, C5 лизина и C3 аспарагина с образованием радикалов •C–H и Fe<sup>3+</sup>–OH.

Перенос гидроксильного радикала •OH от Fe<sup>3+</sup>–OH к •C–H приводит к гидроксилированию боковой цепи аминокислотного остатка, которая не является электрондонорной и не выступает в качестве нуклеофила.

Рис. 22. Структура монооксигенированных остатков пролина, лизина и аспарагина

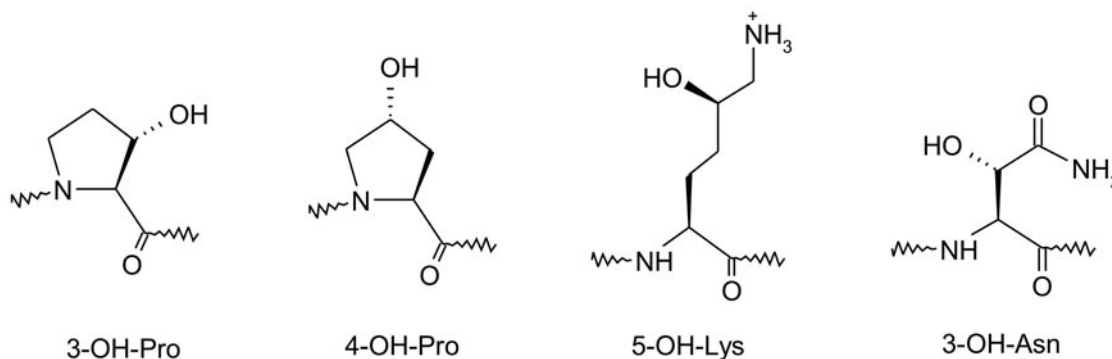
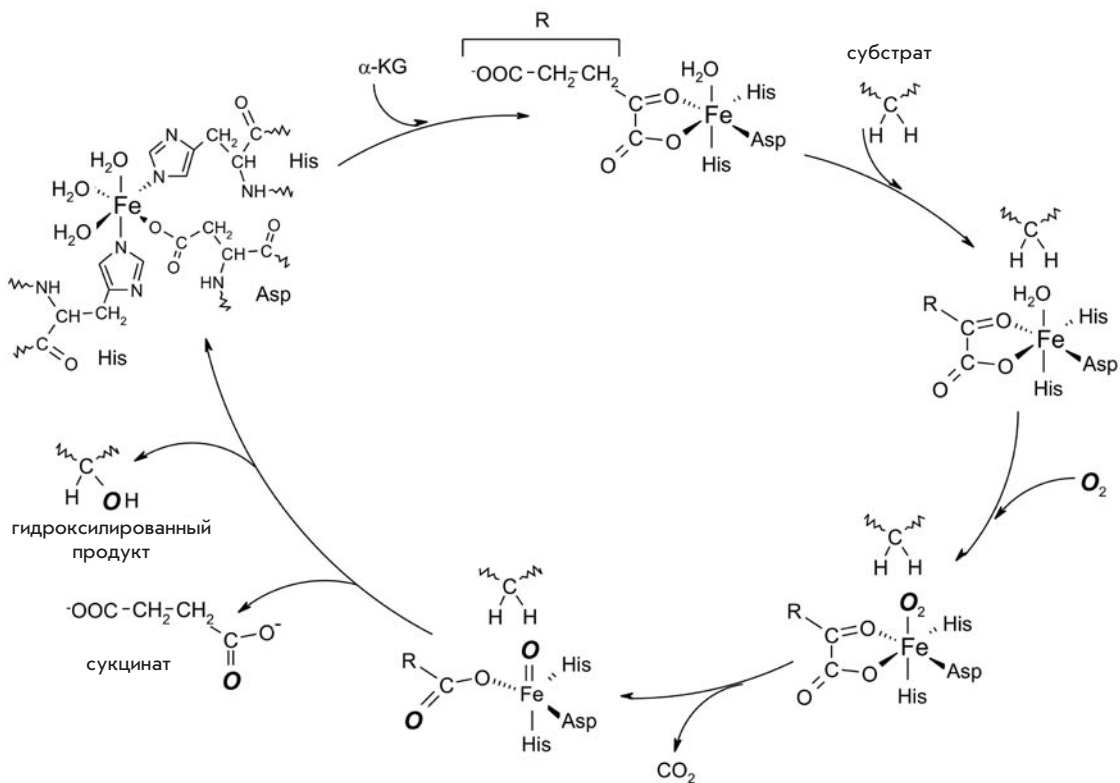


Рис. 23. Механизм реакции гидроксирования



Моноксигеназы, катализирующие реакцию гидроксирования, присоединяют гидроксильный радикал стереоспецифически.

**ПОСТТРАНСЛЯЦИОННОЕ КАРБОКСИЛИРОВАНИЕ ОСТАТКА ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ**

Большинство белковых факторов, участвующих в процессе свертывания крови у млекопитающих, содержат несколько остатков  $\gamma$ -карбоксиглутаминовой кислоты (Gla). Этот оста-

ток появляется в факторах свертывания крови в результате посттрансляционной модификации, заключающейся в фиксации  $\text{CO}_2$   $\gamma$ -метиленовым углеродным атомом глутаминовой кислоты (Glu), во время прохождения факторов по секреторным выводящим путям [164–166]. Боковая цепь остатка Gla, содержащая две отрицательно заряженные карбоксильные группы, способна образовывать хелатные комплексы с двухвалентными катионами, что особенно важно для взаимодействия с ионом  $\text{Ca}^{2+}$  [164].

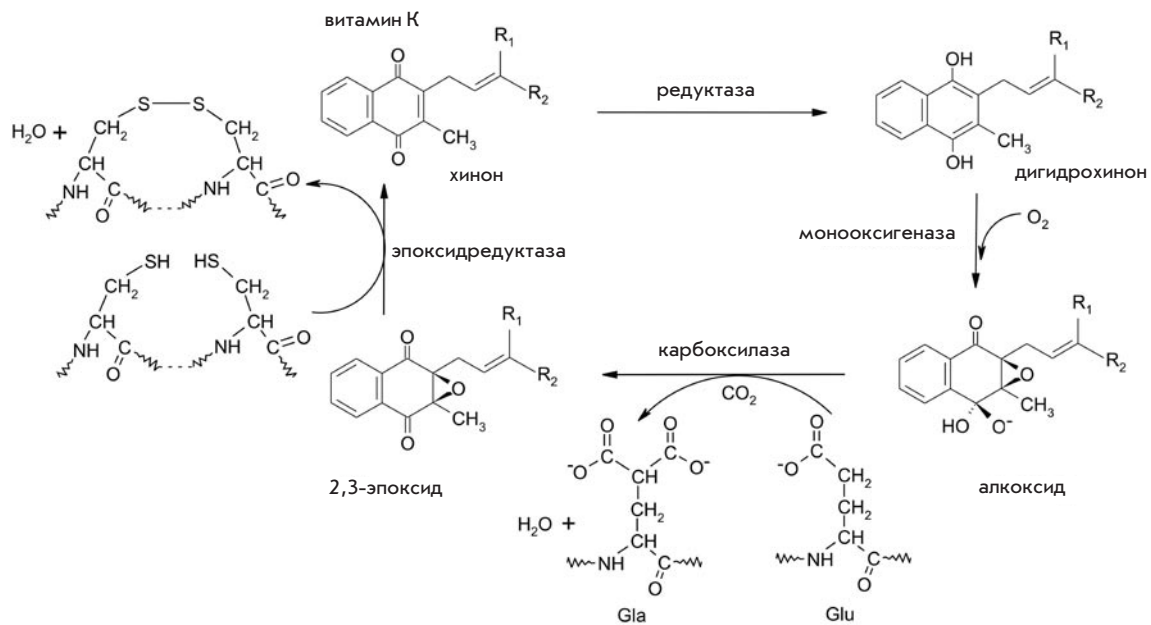


Рис. 24. Витамин К-зависимое карбоксилирование остатка глутаминовой кислоты, катализируемое  $\gamma$ -глутамил-карбоксилазой. 2,3-эпоксид витамина К восстанавливается 2,3-эпоксид-витамина К редуктазой



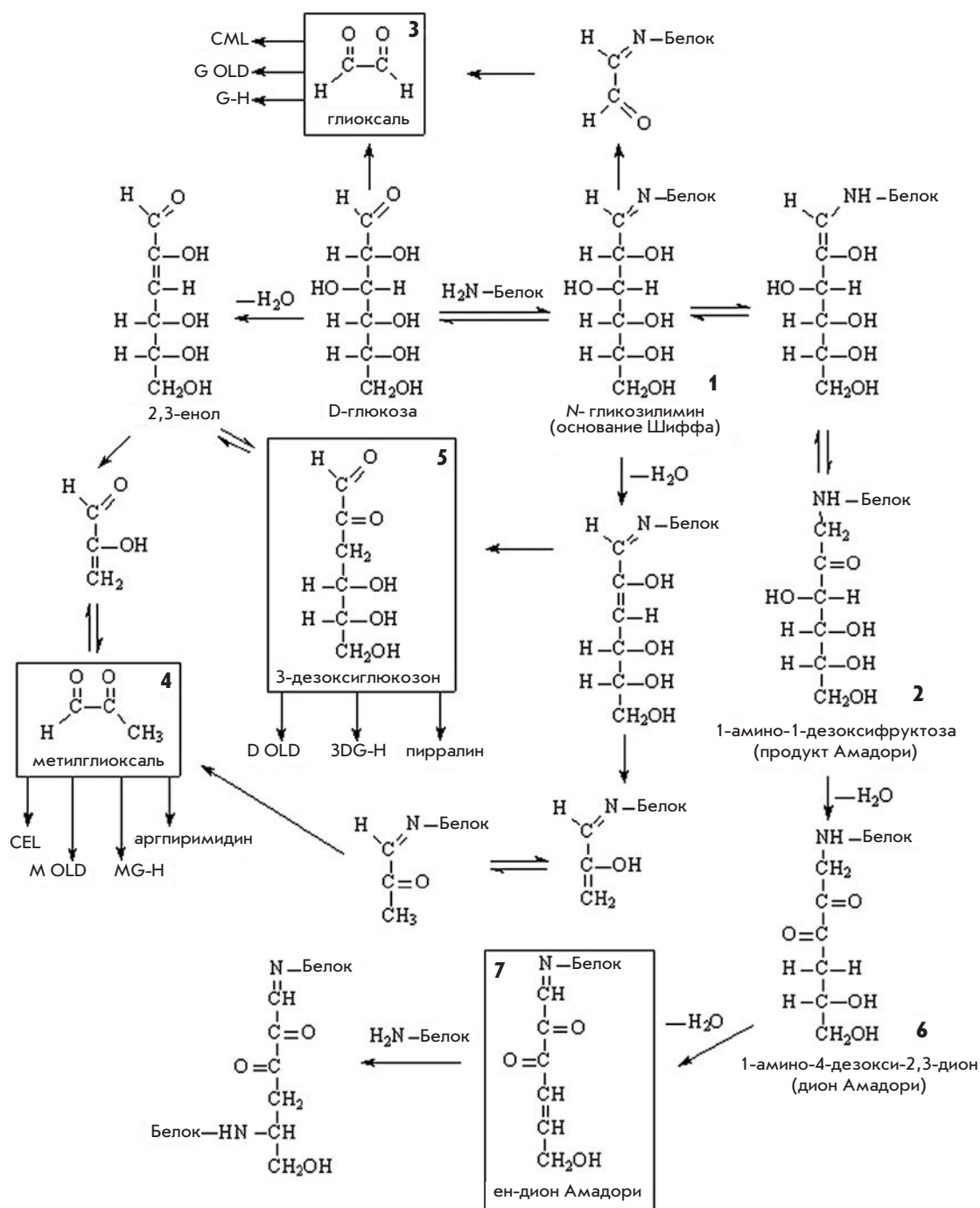


Рис. 25. Схема гликирования белков в присутствии D-глюкозы. В рамке показаны основные предшественники продуктов AGE, образующиеся в результате гликирования

К белкам, содержащим остатки Glu, относятся протромбин, факторы свертываемости крови IX и X, которые представляют собой проферментные формы протеаз [164]. Карбоксилирование 10–12 остатков Glu в N-концевой части проферментов в последовательности, содержащей до 40 аминокислотных остатков, приводит к связыванию нескольких ионов Ca<sup>2+</sup> и изменению конформации факторов свертываемости, которые становятся способными ассоциировать на поверхности тромбоцитов вблизи от протеаз, активирующих факторы

частичным протеолизом и запускающих каскад свертывания крови [164–166].

Карбоксилирование остатка глутаминовой кислоты катализируется γ-глутамилкарбоксилазой (К.Ф. 1.14.99.20), использующей в качестве кофактора восстановленную (дигидронафтохинольную) форму витамина К (рис. 24) [1, 164–166]. В результате реакции окисления восстановленной формы витамина К кислородом образуется гидропероксидный аддукт витамина К, который, циклизуясь в алкоксидный анион 2,3-эпоксида витамина К, генерирует

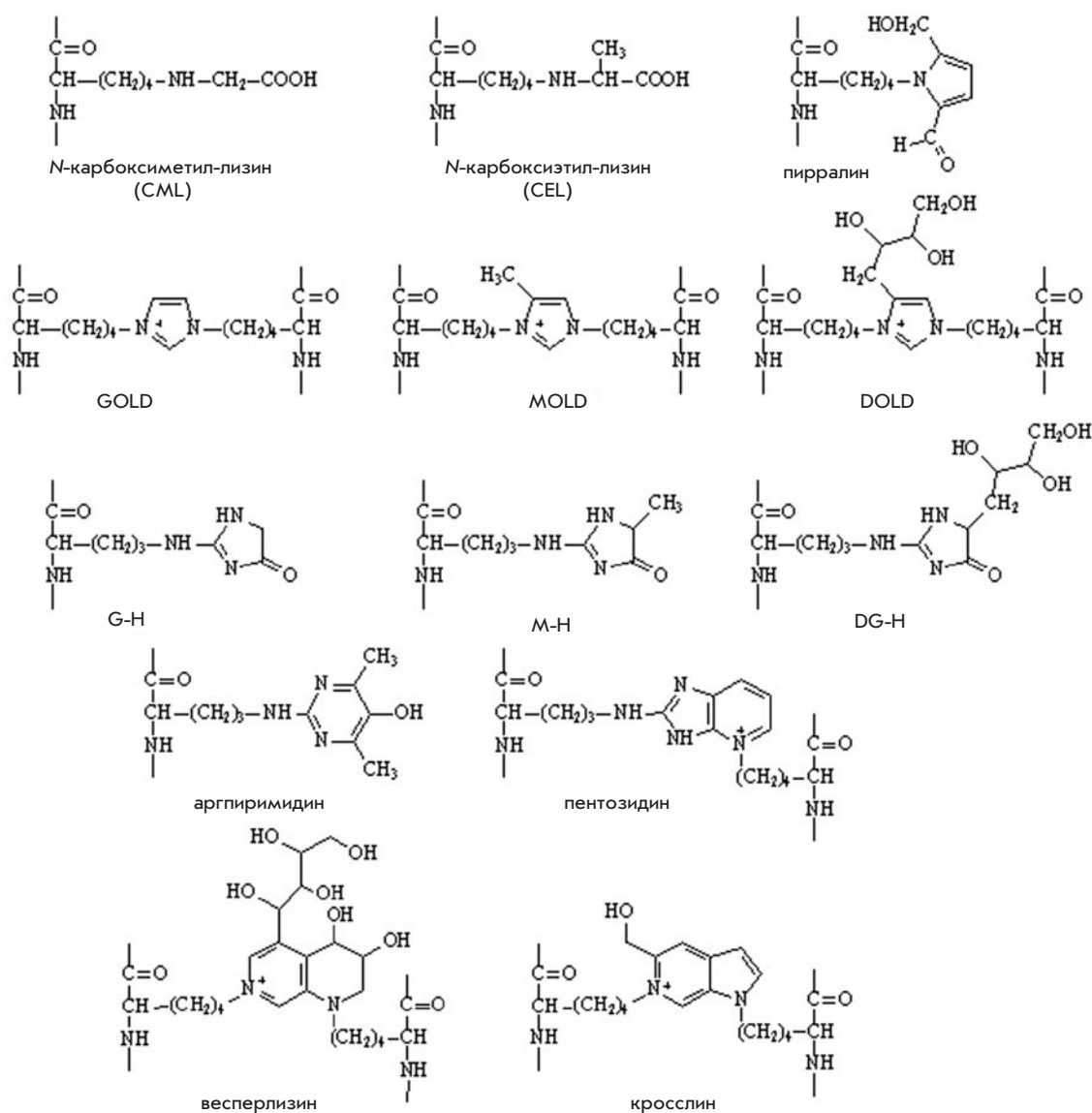


Рис. 26. Структуры некоторых AGEs, образующихся при модификации белков D глюкозой *in vivo*

сильное основание, отщепляющее протон от  $\gamma$ -метиленового углеродного атома глутаминовой кислоты. Образовавшийся карбанион атакует углеродный атом  $CO_2$  с образованием новой C-C связи в малониловой боковой цепи остатка Glu. Восстановление 2,3-эпоксида витамина K в исходную форму происходит под действием 2,3-эпоксидредуктазы (К.Ф. 1.1.4.1), ассоциированной в эндоплазматическом ретикулуме в комплекс с протеиндисульфидизомеразой (К.Ф. 1.8.4.2) [167].

## НЕФЕРМЕНТАТИВНАЯ МОДИФИКАЦИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ГРУПП БЕЛКОВ

### ГЛИКИРОВАНИЕ БЕЛКОВ

Гликирование белков представляет собой эндогенное неферментативное присоединение остатков восстанавливающих сахаров, присутствующих в крови, к боковым радика-

лам лизина или аргинина в составе белка. Схема процесса гликирования, который можно условно разделить на раннюю и позднюю стадии, представлена на рис. 25. На первой стадии гликирования происходит нуклеофильная атака карбонильной группы глюкозы  $\epsilon$ -аминогруппой лизина или гуанидиниевой группировкой аргинина, в результате которой образуется лабильное основание Шиффа – *N*-гликозиллимин (1). Образование основания Шиффа – процесс относительно быстрый и обратимый [168]. Далее происходит перегруппировка *N*-гликозиллимина с образованием продукта Амандори – 1-амино-1-дезоксифруктозы (2). Скорость этого процесса ниже, чем скорость образования гликозиллимина, но существенно выше, чем скорость гидролиза основания Шиффа, поэтому белки, содержащие остатки 1-амино-1-дезоксифруктозы, накапливаются в крови. Модификации остатков лизина в белках на ранней стадии гликирования, по-видимому, способствует наличие

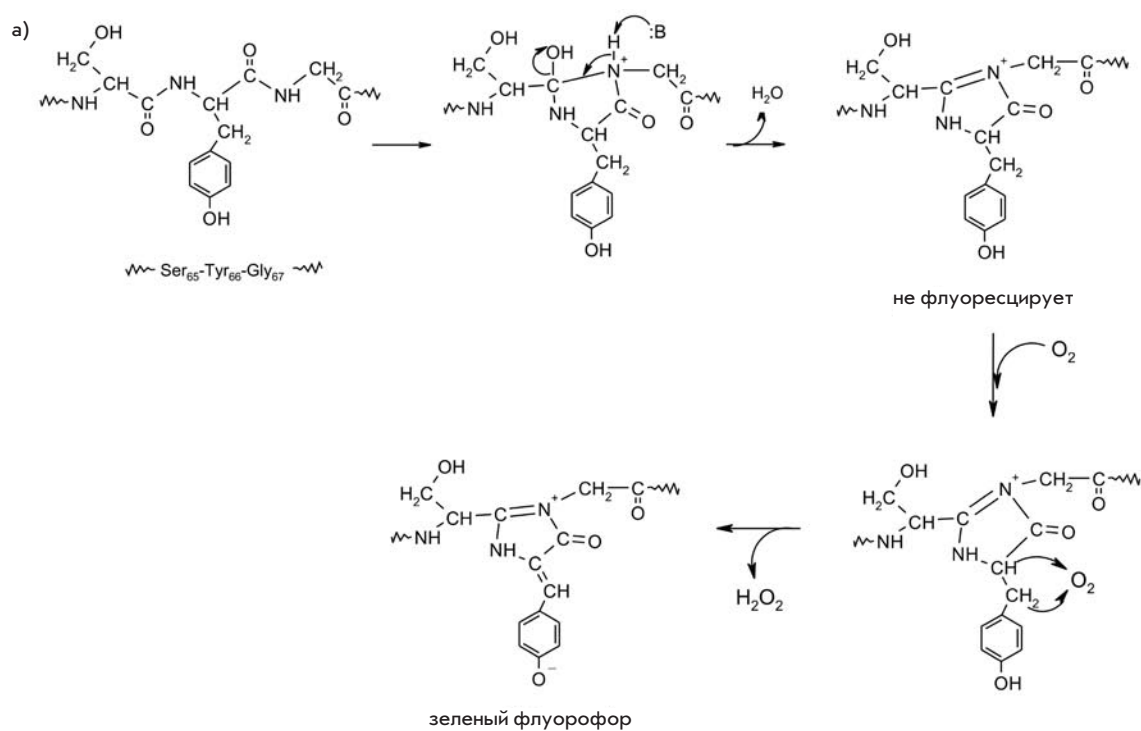
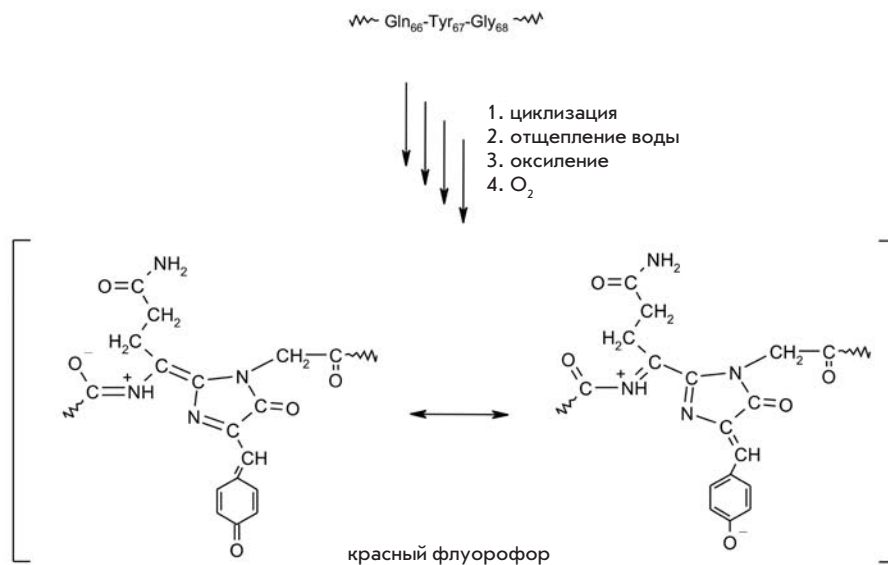


Рис. 27. Схема образования зеленого (а) и красного (б) хромофоров из трипептидов в белках путем внутренней пост-трансляционной автокаталитической циклизации

б)



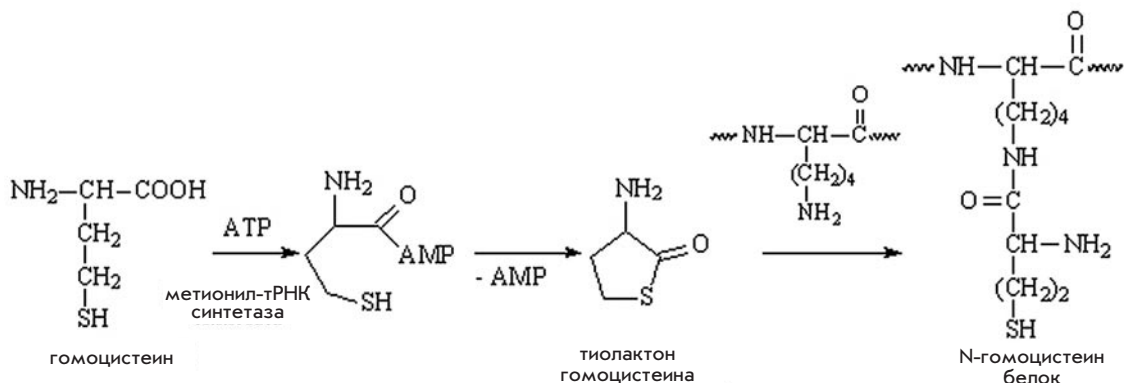
в непосредственной близости от реагирующей аминогруппы остатков гистидина или лизина, которые осуществляют катализ процесса [169].

Поздняя стадия гликирования, включающая дальнейшие превращения *N*-гликозилimina и продукта Амадори, – более медленный и менее изученный процесс, приводящий к образованию стабильных продуктов конечного гликирования (AGEs) (рис. 26). В литературе [170] опубликованы данные о непосредственном участии в формировании AGEs  $\alpha$ -дикарбонильных соединений (глиоксала (3),

метилглиоксала (4), 3-дезоксиглюкозона (5)), образующихся *in vivo* как при деградации глюкозы, так и в результате превращений основания Шиффа при модификации лизина в составе белков глюкозой (рис. 25).

Реакции  $\alpha$ -дикарбонильных соединений с  $\epsilon$ -аминогруппами остатков лизина или гуанидиниевыми группировками остатков аргинина в белках приводят к образованию белковых сшивок, которые ответственны за осложнения, вызванные гликированием белков, при диабете и других заболеваниях. Кроме того, в результате последовательной

Рис. 28. N-гомоцистеинилирование белков тиолактоном гомоцистеина



дегидратации продукта Амандори при C4 и C5 образуются 1-амино-4-дезоксидион (6) и ендиион (7) (рис. 25), которые также могут участвовать в образовании внутримолекулярных и межмолекулярных белковых сшивок [170].

Среди AGEs охарактеризованы  $N_\epsilon$ -карбоксиметил-лизин (CML) и  $N_\epsilon$ -карбоксиэтил-лизин (CEL) [171], бис(лизил)имидазольные аддукты (GOLD, MOLD и DOLD) [172], имидазолы (G-H, MG-H и ZDG-H) [173, 174], пирралин [175], аргпиримидин [176], пентозидин [177], кросслин [178] и весперлизин [179] (рис. 26). Среди них пентозидин, кросслин и весперлизин являются флуорофорами, причем максимум испускания их флуоресценции ( $\lambda_{исп} = 440$  нм) сдвинут в более длинноволновую область относительно флуоресценции остатков триптофана в белках [180]. Это свойство AGEs дает возможность наблюдать за ходом реакции гликирования белков путем измерения флуоресценции при возбуждении на длине волны, характеристической для образующихся в процессе гликирования флуорофоров (глюкофоров).

**ВНУТРЕННЯЯ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННАЯ АВТОКАТАЛИТИЧЕСКАЯ ЦИКЛИЗАЦИЯ**

Один из впечатляющих типов посттрансляционной модификации – это автокаталитическая перестройка пептидного остова в свернутом белке при созревании зеленого флуоресцирующего белка (GFP, green fluorescent protein). Этот белок кодируется одним геном, его хромофор образуется из трех аминокислотных остатков Ser65-Tyr66-Gly67 путем внутренней посттрансляционной автокаталитической циклизации, которая не требует каких бы то ни было кофакторов или субстратов [181–183].

Для образования хромофора необходимо превращение предшественника в структуру  $\beta$ -цилиндра. В свернутом

бесцветном GFP-предшественнике трипептид Ser65-Tyr66-Gly67 находится в пространственно сжатом состоянии, в котором амид Gln-67 может атаковать соседний пептидный карбонил с образованием пятичленного тетраэдрического аддукта (рис. 27, a). Далее аддукт дегидратируется, и образовавшийся стабильный циклический интермедиат медленно автоокисляется с образованием двойной связи, сопряженной с фенольным кольцом Tyr-66. Эта последняя окислительная стадия и генерирует хромофор с максимумом поглощения при 506 нм.

Зеленый флуоресцирующий белок используется в качестве прижизненного маркера, позволяющего исследовать многообразные процессы, происходящие внутри живых клеток и организмов [184–186]. Белки слияния на основе GFP используются для поиска новых лекарств [187, 188], для детекции апоптоза [189], для визуализации динамики хромосом [190] и решения ряда других задач [191, 192]. GFP посвящены отдельные тома в Methods in Enzymology [193] и Methods in Cell Biology [194]. За открытие флуоресцирующих генетических маркеров в 2008 г. была присуждена Нобелевская премия.

В последнее десятилетие быстро растет число исследований с другими цветными белками, подобными GFP, но выделенными из кораллов [195–197]. Недостатком этих белков является ярко выраженная склонность к агрегации, которую, однако, можно преодолеть путем мутагенеза [198]. Схема формирования красного флуорофора из трипептида Gln66-Tyr67-Gly68 в белке представлена на рис. 27, б.

**ГОМОЦИСТЕИНИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ**

В живых организмах подавляющее число процессов метилирования осуществляется S-аденозилметионином, с об-

Рис. 29. S-гомоцистеинилирование белков

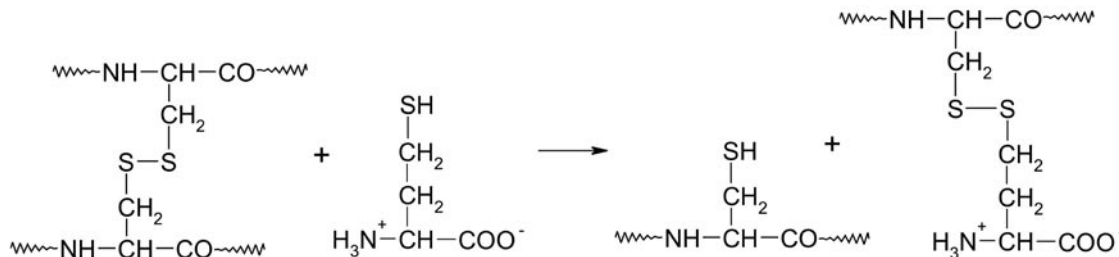
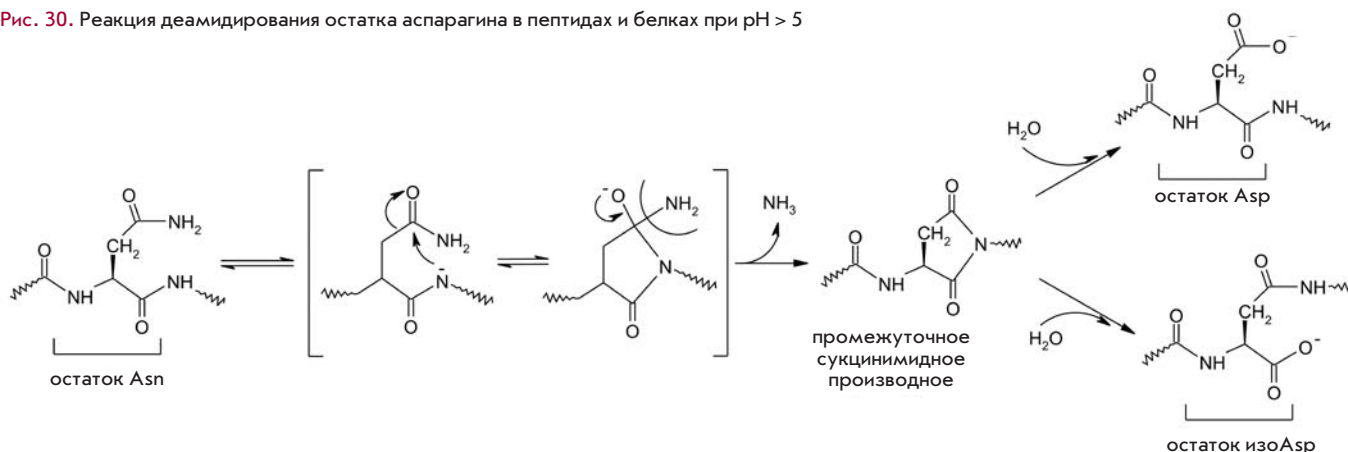


Рис. 30. Реакция деамидирования остатка аспарагина в пептидах и белках при pH > 5



разованием S-аденозилгомоцистеина. Последний гидролизуется ферментом аденозилгомоцистеиназой (К.Ф. 3.3.1.1) до аденозина и гомоцистеина. В реакции, катализируемой метионил-тРНК-синтетазой (КФ 6.1.1.1), гомоцистеин превращается в тиолактон (побочная реакция этого фермента) [199]. Тиолактон гомоцистеина является ацилирующим агентом и может реагировать с функциональной группой остатков лизина [200–203]. При этом происходит нуклеофильная атака ε-аминогруппой лизина карбонильного атома углерода тиолактона, приводящая к раскрытию лактона и образованию дополнительной сульфгидрильной группы (рис. 28).

Такой тип модификации характерен для белков крови (альбумин, гемоглобин, трансферрин, глобулины) [204–207]. В человеческой плазме крови 90 % связанного с белками гомоцистеина входит в состав N-гомоцистеинилированного сывороточного альбумина [201]. Известно, что как *in vitro*, так и *in vivo* основным сайтом гомоцистеинилирования HSA является Lys-525 [208]. Кроме того, идентифицированы два дополнительных сайта модификации альбумина – Lys-4 и Lys-12 [209].

Гомоцистеин может вступать в реакцию дисульфидного обмена с S-S мостиками в белках с образованием S-гомоцистеинилированных белков (рис. 29) [200, 202, 206, 207, 210].

Гомоцистеинилирование белков существенно влияет на их биологическую активность, в т.ч. к повышению чувствительности к окислению, способности к олигомеризации, денатурации и осаждению белков. Введение 8–9 остатков гомоцистеина в метионил-тРНК-синтетазу и 11–12 в трипсин полностью инактивируют эти белки [207]. N-гомоцистеинилирование человеческого сывороточного альбумина существенно снижает его РНК-гидролизующую активность [205]. Множественное гомоцистеинилирование клеточных белков может приводить, в конечном счете, к апоптозу клетки [200, 201, 203, 206, 210].

**ДЕАМИДИРОВАНИЕ И ТРАНСАМИДИРОВАНИЕ**

Одним из видов посттрансляционной модификации, играющей важную роль в функционировании клетки, является деамидирование амидов дикарбоновых аминокислот. Реакция представляет собой, по мнению многих авторов, нефер-

ментативное отщепление аммиака от амидной группы аспарагина или глутамина через образование промежуточного продукта – циклического имида (рис. 30) [211–215]. Скорость образования этого продукта определяется локальным аминокислотным окружением, свойствами раствора (рН и составом) [213, 214]. Остаток аспарагина в белках подвергается деамидированию в 40 раз чаще, чем остаток глутамина, при этом скорость деамидирования аспарагина в 100 раз быстрее скорости деамидирования глутамина [214].

Циклический имид может распадаться с образованием или остатка аспартата, который образуется в большем количестве (3:1), или остатка изоаспартата, в котором в образовании пептидной связи участвует β-карбоксильная группа боковой цепи аспартата [216, 217]. В последнем случае длина белка увеличивается на одну метиленовую группу (CH<sub>2</sub>), что может влиять на структуру и функции белка, в т.ч. и его стабильность [214, 216, 217].

Реакция деамидирования приводит к появлению дополнительной ионизируемой карбоксильной группы, имеющей

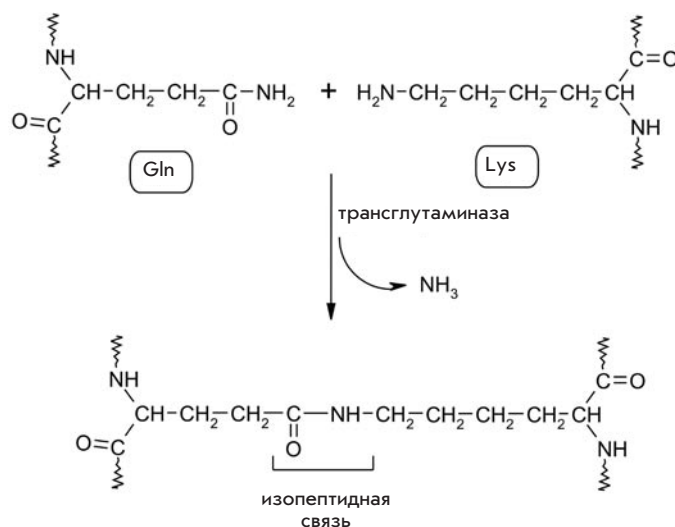


Рис. 31. Реакция трансамидирования, катализируемая трансглутаминой (К.Ф. 2.3.2.13)

при физиологических значениях pH отрицательный заряд, что меняет общий заряд белка, его пространственную структуру [214].

$\beta$ -Изопептидная связь, образованная боковыми цепями остатков лизина и глутамина и воспринимаемая организмом как отклонение от нормальной пептидной связи, в образовании которой участвуют  $\alpha$ -аминогруппы и карбоксильные группы аминокислот, корректируется с помощью протеинизоаспартил-*O*-метилтрансферазы (PIMT) (К.Ф. 2.1.1.77), широко распространенного клеточного фермента [211, 212, 216]. Реакция деамидирования Asn/Gln и дефицит PIMT вызывают серьезные заболевания у человека: катаракту [218], болезнь Альцгеймера [219], аутоиммунные заболевания [220], прион-зависимые энцефалопатии [214, 221, 222].

По гипотезе Робинсона нестабильность аспарагинового и глутаминового остатков в составе клеточных белков в физиологических условиях определяет их важнейшую биологическую функцию, а именно служит программируемыми молекулярными часами, определяющими время жизни белков и пептидов [212, 223, 224].

Деамидирование, как и ADP-рибозилирование, может вызываться также бактериальными токсинами. Цитотоксический некротический фактор 1 из *Escherichia coli* (CNF1) и дермонекротический токсин *Bordetella* (DNT) деа-

мидируют малые GТРАЗЫ человека: Rho A (Gln63), Rac1 и Cdc42 (Gln61), что приводит к блокированию гидролиза GTP и нарушению регуляции перестроек цитоскелета клетки [225–228].

Деамидирование довольно часто сопряжено с последующим трансамидированием (взаимодействием  $\epsilon$ -аминогруппы остатка лизина в белке с боковой цепью остатка глутамина в том же белке), представляющим собой один из видов шивок, характерных для посттрансляционной модификации (рис. 31) [228–232].

В результате образуются многочисленные связи между остатками глутамина и лизина в молекулах белка, что приводит к образованию белкового агрегата с большой молекулярной массой, субъединицы которого связаны поперечными шивками. Это имеет важное значение в метаболизме кожных и волосных покровов, тромбообразовании и заживлении ран [233]. ●

*Работа по влиянию химической модификации человеческого сывороточного альбумина на РНК-гидролизующую активность белка выполнена при поддержке Междисциплинарного интеграционного проекта фундаментальных исследований СО РАН № 88 и гранта РФФИ 09-04-01483а.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Walsh C.T., Garneau-Tsodikova S., Gatto G.J. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005. V. 44. № 45. P. 7342–7372.
- Lehninger A. *Principles of Biochemistry*. New York: W.H. Freeman and Company. 2008.
- Karpeyev M.Y., Ivanov V.I. *Nature*. 1966. V. 210. № 30. P. 493–496.
- Lowe J.N., Ingraham L.L. *An Introduction to Biochemical Reactions Mechanisms*. Chap. 3. *Foundation of Molecular Biology Series*. New Jersey: Prentice-Hall, Englewood Cliffs. 1974.
- Hubbard S.R.. *Handbook of Cell Signaling*. 2009. ch. 58. P. 413–418.
- Hubbard S.R., Miller W.T. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2007. V. 19. № 2. P. 117–123.
- Ubersax J.A., Ferrell J.E.Jr. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007. V. 8. № 7. P. 530–541.
- Beene D.L., Scott J.D. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2007. V. 19. № 2. P. 192–198.
- Aleman R., Perona J.S., Sanchez-Dominguez J.M., Montero E., Canizares J., Escriba P.V. *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. V. 1768. № 4. P. 964–975.
- Saltiel A.R., Pessin J.E. *Trends Cell Biol.* 2002. V. 12. № 2. P. 65–71.
- Maures T.J., Kurzer J.H., Carter-Su C. *Trends Endocrinol. Metab.* 2007. V. 18. № 1. P. 38–45.
- Patwardhan P., Miller W.T. *Cell. Signal.* 2007. V. 19. № 11. P. 2218–2226.
- Lieser S.A., Aubol B.E., Wong L., Jennings P.A., Adams J.A. *Biochim. Biophys. Acta.* 2005. V. 1754. № 1–2. P. 191–199.
- Bublil E.M., Yarden Y. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2007. V. 19. № 2. P. 124–134.
- Dorsam R.T., Gutkind J.S. *Nat. Rev. Cancer.* 2007. V. 7. № 2. P. 79–94.
- Viallard J.F., Lacombe F., Belloc F., Pellegrin J.L., Reiffers J. *Cancer Radiother.* 2001. V. 5. № 2. P. 109–129.
- Syeed A.S., Vohra H., Gupta A., Ganguly N. *Curr. Science.* 2001. V. 80. № 3. P. 349–360.
- Nakagami H., Pitzschke A., Hirt H. *Trends Plant Sci.* 2005. V. 10. № 7. P. 339–346.
- Chau B.N., Wang J.Y.J. *Nat. Rev. Cancer.* 2003. V. 3. P. 130–138.
- Johnson L.N., Lewis R.J. *Chem. Rev.* 2001. V. 101. № 8. P. 2209–2242.
- Birnbaumer L. *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. V. 1768. № 4. P. 756–771.
- Cooper D.M.F., Crosshwaite A.J. *Trends Pharmacol. Sci.* 2006. V. 27. № 8. P. 26–431.
- Willoughby D., Cooper D.M.F. *Physiol. Rev.* 2007. V. 87. P. 965–1010.
- Deng X., Mercer P.F., Scotton C.J., Gilchrist A., Chambers R.C. *Mol. Biol. Cell.* 2008. V. 19. № 6. P. 2520–2533.
- Xu Y. *Cell Death Differ.* 2003. V. 10. № 4. P. 400–403.
- Lindner H.H. *Electrophoresis.* 2008. V. 29. № 12. P. 2516–2532.
- Sarg B., Chwatal S., Talasz H., Lindner H.H. *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. № 6. P. 3610–3618.
- Dahmus M.E. *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. № 32. P. 19009–19012.
- Lee T.I., Young R.A. *Annu. Rev. Genet.* 2000. 34. P. 77–137
- Bottomley M.J. *EMBO Rep.* 2004. V. 5. № 5. P. 464–469.
- Owen D.J., Ornaghi P., Yang J.-C., Lowe N., Evans P.R., Ballario P., Neuhaus D., Filetici P., Travers A.A. *EMBO J.* 2000. V. 19. № 22. P. 6141–6149.
- Mukherjee S., Hao Y.-H., Orth K. *Trends Biochem. Sci.* 2007. V. 32. № 5. P. 210–216.
- Margueron R., Trojer P., Reinberg D. *Curr. Opin. Gen. Develop.* 2005. V. 15. № 2. P. 163–176.
- Shen S., Casaccia-Bonnel P. *J. Mol. Neurosci.* 2008. V. 35. № 1. P. 13–22.
- Iizuka M., Smith M.M. *Curr. Opin. Gen. Develop.* 2003. V. 13. № 2. P. 154–160.
- Couture J.F., Trievel R.C. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2006. V. 16. № 6. P. 753–760.
- Cole P.A. *Nat. Chem. Biol.* 2008. V. 4. № 10. P. 590–597.
- Strahl B.D., Allis C.D. *Nature.* 2004. V. 430. № 6765. P. 41–45.
- Khorasanizadeh S. *Cell.* 2004. V. 116. № 2. P. 259–272.
- Feng L., Lin T., Uranishi H., Gu W., Xu Y. *Mol. Cell Biol.* 2005. V. 25. № 13. P. 5389–5395.
- Desmeules P., Penney S.-E., Desbat B., Saless C. *Biophys. J.* 2007. V. 93. № 6. P. 2069–2082.
- Farazi T.A., Waksman G., Gordon J.I. *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 43. P. 39501–39504.
- Smotryz J.E., Linder M.E. *Annu. Rev. Biochem.* 2004. V. 73. P. 559–587.
- Tanimura N., Saitoh S., Kawano S., Kosugi A., Miyake K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006. V. 341. № 4. P. 1177–1183.
- Resh M.D. *Biochim. Biophys. Acta.* 1999. V. 1451. № 1. P. 1–16.
- Adams J.A. *Chem. Rev.* 2001. V. 101. № 2. P. 2271–2290.
- Pechlivanis M., Kuhlmann J. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006. V. 1764. № 12. P. 1914–1931.
- Selvakumar P., Lakshmiikuttyamma A., Shrivastava A., Das S.B., Dimmock J.R., Sharma R.K. *Progr. Lipid Res.* 2007. V. 46. № 1. P. 1–36.
- Dietrich L.E.P., Ungermann C. *EMBO Rep.* 2004. V. 5. № 11. P. 1053–1057.
- Drisdell R.C., Alexander J.C., Sayeed A., Green W.N. *Methods.* 2006. V. 40. № 2. P. 127–134.
- Hemsley P. A., Grierson C.S. *Trends Plant Sci.* 2008. V. 13. № 6. P. 295–302.
- Pickart C.M. *Annu. Rev. Biochem.* 2001. V. 70. P. 503–533.
- Glickman M.H., Ciechanover A. *Physiol. Rev.* 2002. V. 82. № 2. P. 373–428.
- Pickart C.M. *Cell.* 2004. V. 116. № 2. P. 181–190.
- Finley D., Ciechanover A., Varshavsky A. *Cell.* 2004. V. 116. 2 Suppl. P. S29–S32.
- Capili A.D., Lima C.D. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2007. V. 17. № 6. P. 726–735.
- Pickart C. M., Eddins M. J. *Biochim. Biophys. Acta.* 2004. V. 1695. № 1–3. P. 55–72.
- Herrmann J., Lerman L.O., Lerman A. *Circ. Res.* 2007. V. 100. № 9. P. 1276–1291.
- Schwartz D.C., Hochstrasser M. *Trends Biochem. Sci.* 2003. V. 28. № 6. P. 321–328.
- Li W., Ye Y. *Cell. Mol. Life Sci.* 2008. V. 65. № 15. P. 2397–2406.
- Pickart C.M., Fushman D. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2004. V. 8. № 6. P. 610–616.
- Aguilar R.C., Wendland B. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2003. V. 15. № 2. P. 184–190.
- Pickart C.M. *Mol. Cell.* 2001. V. 8. № 3. P. 499–504.
- Gill G. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2005. V. 15. № 5. P. 536–541.
- Smith B.C., Denu J.M. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009. V. 1789. № 1. P. 45–57.
- Scoumanne A., Chen X. *Histol. Histopathol.* 2008. V. 23. № 9. P. 1143–1149.
- Marmorstein R., Trievel R.C. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009. V. 1789. № 1. P. 58–68.
- Berger S.L. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2002. V. 12. № 2. P. 142–148.

69. Loyola A., Almouzni G. *Trends Biochem. Sci.* 2007. V. 32. № 9. P. 425–433.
70. Lachner M., Jenuwein T. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2002. V. 14. № 3. P. 286–298.
71. de La Roche Saint-André C. *Biochimie*. 2005. V. 87. № 7. P. 603–612.
72. Kiefer J.C. *Develop. Dynamics*. 2007. V. 236. № 4. P. 1144–1156.
73. Lane K.T., Beese L.S. *J. Lipid Res.* 2006. V. 47. № 4. P. 681–699.
74. Leung K.F., Baron R., Seabra M.C. *J. Lipid Res.* 2006. V. 47. № 3. P. 467–475.
75. Pylypenko O., Rak A., Durek T., Kushnir S., Dursina B.E., Thome N.H., Constantinescu A.T., Brunsfeld L., Watzke A., Waldmann H., Goody R.S., Alexandrov K. *EMBO J.* 2006. V. 25. № 1. P. 13–23.
76. Lu J.-Y., Hofmann S.L. *J. Lipid Res.* 2006. V. 47. № 7. P. 1352–1357.
77. Kinsella B.T., Erdman R.A., Maltese W.A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991. V. 88. № 20. P. 8934–8938.
78. Maltese W.A. *FASEB J.* 1990. V. 4. № 15. P. 3319–3328.
79. Basso A.D., Kirschmeier P., Bishop W.R. *J. Lipid Res.* 2006. V. 47. № 1. P. 15–31.
80. Magee T., Seabra M.C. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2005. V. 17. № 2. P. 190–196.
81. Lan F., Nottke A.C., Shi Y. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2008. V. 20. № 3. P. 316–325.
82. Shi Y., Lan F., Matson C., Mulligan P., Whetstone J.R., Cole P.A., Casero R.A. *Cell.* 2004. V. 119. № 7. P. 941–953.
83. Tsvakada Y., Fang J., Erdjument-Bromage H., Warren M. E., Borchers C.H., Tempst P., Zhang Y. *Nature*. 2006. V. 439. № 7078. P. 811–816.
84. Baron R.A., Seabra M.C. *Biochem. J.* 2008. V. 415. № 1. P. 67–75.
85. Roberts P.J., Mitin N., Keller P.J., Chenette E.J., Madigan J.P., Currin R.O., Cox A.D., Wilson O., Kirschmeier P., Der C.J. *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. № 37. P. 25150–25163.
86. Wright L.P., Phillips M.R. *J. Lipid Res.* 2006. V. 47. № 5. P. 883–891.
87. Leung K.F., Baron R., Ali B.R., Magee A.I., Seabra M.C. *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. № 2. P. 1487–1497.
88. Lehle L., Strahl S., Tanner W. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2006. V. 45. № 41. P. 6802–6818.
89. Lowe J.B., Marth J.D. *Annu. Rev. Biochem.* 2003. V. 72. P. 643–691.
90. Parodi A.J. *Annu. Rev. Biochem.* 2000. V. 69. P. 69–93.
91. Parodi A.J. *Biochem. J.* 2000. V. 348. Pt. 1. P. 1–13.
92. Caramelo J.J., Parodi A. *J. Semin. Cell. Dev. Biol.* 2007. V. 18. № 6. P. 732–742.
93. Deprez P., Gautschi M., Helenius A. *Mol. Cell.* 2005. V. 19. № 2. P. 183–195.
94. Dejgaard S., Nicolay J., Taheri M., Thomas D.Y., Bergeron J.J.D. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2004. V. 6. № 1. P. 29–42.
95. Roth J. *Chem. Rev.* 2002. V. 102. № 2. P. 285–303.
96. Lis H., Sharon N. *Eur. J. Biochem.* 1993. V. 218. № 1. P. 1–27.
97. Zachara N.E., Hart G.W. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006. V. 1761. № 5–6. P. 599–617.
98. Wells L., Whelan S.A., Hart G.W. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. V. 302. № 3. P. 435–441.
99. Goto M. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2007. V. 71. № 6. P. 1415–1427.
100. Gerken T.A., Gilmore M., Zhang J. *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 10. P. 7736–7751.
101. Ohtsubo K., Marth J.D. *Cell.* 2006. V. 126. № 5. P. 855–867.
102. Haines N., Irvine K.D. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2003. V. 4. № 10. P. 786–797.
103. Bojarova P., Williams S.J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2008. V. 12. № 5. P. 573–581.
104. Chapman E., Best M.D., Hanson S.R., Wong C.-H. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2004. V. 43. № 27. P. 3526–3548.
105. Ghosh D. *Cell. Mol. Life Sci.* 2007. V. 64. № 15. P. 2013–2022.
106. Hanson S.R., Best M.D., Wong C.-H. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2004. V. 43. № 43. P. 5736–5763.
107. Koch-Nolte F., Adriouch S., Bannas P., Krebs C., Scheuplein F., Seman M., Haag F. *Ann. Med.* 2006. V. 38. № 3. P. 188–199.
108. Sakurai J., Nagahama M., Hisatsune J., Katunuma N., Tsuge H. *Advan. Enzyme Regul.* 2003. V. 43. P. 361–377.
109. Tsuge H., Nagahama M., Nishimura H., Hisatsune J., Sakaguchi Y., Itogawa Y., Katunuma N., Sakurai J. *J. Mol. Biol.* 2003. V. 325. № 3. P. 471–483.
110. Holbourn K.P., Sutton J.M., Evans H.E., Shone C.C., Acharya K.R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. № 15. P. 5357–5362.
111. Krueger K.M., Barbieri J.T. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995. V. 8. № 1. P. 34–47.
112. Kaslow H.R., Lim L.K., Moss J., Lesikar D.D. *Biochemistry*. 1987. V. 26. № 1. P. 123–127.
113. Spangler B.D. *Microbiol. Rev.* 1992. V. 56. № 4. P. 622–647.
114. Collier R.J. *Bacteriol. Rev.* 1975. V. 39. № 1. P. 54–85.
115. Jorgensen R., Merrill A.R., Andersen G.R. *Biochem. Soc. Trans.* 2006. V. 34. Pt. 1. P. 1–6.
116. Jorgensen R., Merrill A.R., Yates S.P., Marquez V.E., Schwan A.L., Boesen T., Andersen G.R. *Nature*. 2005. V. 436. № 7053. P. 979–984.
117. Yates S.P., Jorgensen R., Andersen G.R., Merrill A.R. *Trends Biochem. Sci.* 2006. V. 31. № 2. P. 123–133.
118. Lindahl T. *Nature*. 1993. V. 362. № 6422. P. 709–715.
119. Sharer O.D. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2003. V. 42. P. 2946–2974.
120. Bernstein C., Bernstein H., Payne C.M., Garewal H. *Mutat. Res.* 2002. V. 511. № 2. P. 145–178.
121. Althaus F.R., Kleczowska H.E., Malanga M., Muntener C.R., Pleschke J.M., Ebner M., Auer B. *Mol. Cell. Biochem.* 1999. V. 193. № 1–2. P. 5–11.
122. Hassa P.O., Haenni S.S., Elser M., Hottiger M.O. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2006. V. 70. № 3. P. 789–829.
123. D'Amours D., Desnoyers S., D'Silva I., Poirier G.G. *Biochem. J.* 1999. V. 342. Pt. 2. P. 249–268.
124. Nguewa P.A., Fuertes M.A., Valladares B., Alonso C., Perez J.M. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2005. V. 88. № 1. P. 143–172.
125. Schreiber V., Dantzer F., Ame J.C., de Murcia G. *Natl. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2006. V. 7. № 7. P. 517–528.
126. Fan J., Wilson D.M. *Free Radic. Biol. Med.* 2005. V. 38. № 9. P. 1121–1138.
127. Sallmann F.R., Vodenicharov M.D., Wang Z.Q., Poirier G.G. *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 20. P. 15504–15511.
128. Ame J.C., Spenlehauer C., de Murcia G. *BioEssays*. 2004. V. 26. № 8. P. 882–893.
129. Kim M.Y., Zhang T., Kraus W.L. *Genes Dev.* 2005. V. 19. № 17. P. 1951–1967.
130. Yamanaka H., Penning C.A., Willis E.H., Wasson D.B., Carson D.A. *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. № 8. P. 3879–3883.
131. Ikejima M., Marsischky G., Gill D.M. *J. Biol. Chem.* 1987. V. 262. № 36. P. 17641–17650.
132. Kawauchi M., Ueda K., Hayaishi O. *J. Biol. Chem.* 1980. V. 255. № 3. P. 816–819.
133. Ueda K., Kawauchi M., Okayama H., Hayaishi O. *J. Biol. Chem.* 1979. V. 254. № 3. P. 679–687.
134. Alvarez-Conzalez R. *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. № 33. P. 17690–17696.
135. Rolli V., O'Farrell M., Menissier de Murcia J., de Murcia G. *Biochemistry*. 1997. V. 36. № 40. P. 12147–12154.
136. Miwa M., Saikawa N., Yamaizumi Z., Nishimura S., Sugimura T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979. V. 76. № 2. P. 595–599.
137. Mendoza-Alvarez H., Alvarez-Conzalez R. *Biochemistry*. 1987. V. 26. № 11. P. 3218–3224.
138. Mendoza-Alvarez H., Alvarez-Conzalez R. *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. № 30. P. 22575–22580.
139. Zahradka P., Ebisuzaki K. *J. Biol. Chem.* 1984. V. 259. № 2. P. 986–995.
140. Lindahl T. *Mutat. Res.* 2000. V. 462. № 2–3. P. 129–135.
141. Tanuma S., Yagi T., Johnson G.S. *Arch. Biochem. Biophys.* 1985. V. 237. № 1. P. 38–42.
142. Hassa P.O., Haenni S.S., Elser M., Hottiger M.O. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2006. V. 70. № 3. P. 789–829.
143. Ying J., Clavreul N., Sethuraman M., Adachi T., Cohen R.A. *Free Radic. Biol. Med.* 2007. V. 43. № 8. P. 1099–1108.
144. Giles N.M., Giles G.I., Jacob C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. V. 300. № 1. P. 1–4.
145. Jones D.P., Go Y.-M., Anderson C.L., Ziegler T.R., Kinkade J.M., Kirilov W.G. *FASEB J.* 2004. V. 18. № 11. P. 1246–1248.
146. Go Y.-M., Jones D.P. *Biochim. Biophys. Acta.* 2008. V. 1780. № 11. P. 1273–1290.
147. Jacob C., Giles G.I., Giles N.M., Sies H. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2003. V. 42. № 39. P. 4742–4758.
148. Giles N.M., Watts A.B., Giles G.I., Fry F.H., Littlechild J.A., Jacob C. *Chem. Biol.* 2003. V. 10. № 8. P. 677–693.
149. Kemp M., Go Y.-M., Jones D.P. *Free Radic. Biol. Med.* 2008. V. 44. № 6. P. 921–937.
150. Iwakiri Y., Satoh A., Chatterjee S., Toomre D.K., Chalouni C.M., Fulton D., Grossmann R.J., Shah V.H., Sessa W.C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. № 52. P. 19777–19782.
151. Yang Y., Loscalzo J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. № 1. P. 117–122.
152. Doctor A., Platt R., Sheram M.L., Eiseheid A., McMahon T., Maxey T., Doherty J., Axelrod M., Kline J., Gurka M., Gow A., Gaston B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. № 16. P. 5709–5714.
153. Torta F., Usueli V., Malgaroli A., Bachi A. *Proteomics*. 2008. V. 8. № 21. P. 4484–4494.
154. Stamler J.S., Lamas S., Fang F.C. *Cell.* 2001. V. 106. № 6. P. 675–683.143.
155. Myllyharju J., Kivirikko K.I. *Trends Gen.* 2004. V. 20. № 1. P. 33–43.
156. Koivunen P., Hirsila M., Gunzler V., Kivirikko K.I., Myllyharju J. *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 11. P. 9899–9904.
157. Lando D., Peet D.J., Whelan D.A., Gorman J.J., Whitelaw M.L. *Science*. 2002. V. 295. № 5556. P. 858–861.
158. Clifton L.J., Hsueh L.C., Baldwin J.E., Harlos K., Schofield C.J. *Eur. J. Biochem.* 2001. V. 268. № 24. P. 6625–6636.
159. Bruick R.K., McKnight S.L. *Science*. 2001. V. 294. № 5545. P. 1337–1340.
160. Ratcliffe P.J. *Blood. Purif.* 2002. V. 20. № 5. P. 445–450.
161. Marxsen J.H., Stengel P., Doege K., Heikinen P., Jokilehto T., Wagner T., Jelkmann W., Jaakkola P., Metzner E. *Biochem. J.* 2004. V. 381. Pt. 3. P. 761–767.
162. Huang L.E., Gu J., Schau M., Bunn F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. № 14. P. 7987–7992.
163. Kallio P.J., Wilson W.J., O'Brien S., Makino Y., Poellinger L. *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. № 10. P. 6519–6525.
164. Furie B., Bouchard B.A., Furie B.C. *Blood*. 1999. V. 93. № 6. P. 1798–1808.
165. Bandyopadhyay P.K. *Vitam. Horm.* 2008. V. 78. P. 157–184.
166. Stafford D.W. *J. Thromb. Haemost.* 2005. V. 3. № 8. P. 1873–1878.
167. Wajih N., Hutson S.M., Wallin R. *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. № 4. P. 2626–2635.
168. Ulrich P., Cerami A. *Recent Prog. Horm. Res.* 2001. V. 56. P. 1–21.
169. Acosta J., Hettinga J., Fluckiger R., Krumrei N., Goldfine A., Angarita L., Halperin J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. № 10. P. 5450–5455.
170. Thornalley P.J., Langborg A., Minhas H.S. *Biochem. J.* 1999. V. 344. № 1. P. 109–116.
171. Ramirez P., Del Razo L.M., Gutierrez-Ruiz M.C., Gonshebbat M.E. *Carcinogenesis*. 2000. V. 21. № 4. P. 701–706.
172. Frye E.B., Degenhardt T.P., Thorpe S.R., Baynes J.W. *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. № 30. P. 18714–18719.
173. Paul R.G., Avery N.C., Slatter D.A., Sims T.J., Bailey A.J. *Biochem. J.* 1998. V. 330. № 3. P. 1241–1248.
174. Niwa T., Katsuzaki T., Ishizaki Y., Hayase F., Miyazaki T., Uematsu T., Tatemichi N., Takei Y. *FEBS Lett.* 1997. V. 407. № 3. P. 297–302.
175. Hayase F., Nagaraj R.H., Miyata S., Njoroge F.G., Monnier V.M. *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. № 7. P. 3758–3764.
176. Wilker S.C., Chellan P., Arnold B.M., Nagaraj R.H. *Anal. Biochem.* 2001. V. 290. № 2. P. 353–358.

177. Sell D.R., Monnier V.M. *J. Clin. Invest.* 1990. V. 85. P. 380–384.
178. Obayashi H., Nakano K., Shigeta H., Yamaguchi M., Yoshimori K., Fukui M., Fujii M., Kitagawa Y., Nakamura N., Nakazawa Y., Ienaga K., Ohta M., Nishimura M., Fukui I., Kondo M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996. V. 226. № 1. P. 37–41.
179. Tessier F., Obrenovich M., Monnier V.M. *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. № 30. P. 20796–20804.
180. Schmitt A., Schmitt J., Muench G., Gasic-Milencovich J. *Anal. Biochem.* 2005. V. 338. P. 201–215.
181. Tsien R. *Annu. Rev. Biochem.* 1998. V. 67. P. 509–544.
182. Зубова Н.Н., Булавина А.Ю., Савицкий А.П. *Успехи биол. химии.* 2003. Т. 43. С. 163–224.
183. Zimmer M. *Chem. Rev.* 2002. V. 103. № 3. P. 759–781.
184. Wouters F.S., Verveer P.J., Bastiaens P.I. *Trends Cell. Biol.* 2001. V. 11. № 5. P. 203–211.
185. Toomre D., Manstein D.J. *Trends Cell. Biol.* 2001. V. 11. № 7. P. 298–303.
186. Зубова Н.Н., Савицкий А.П. *Успехи биол. химии.* 2005. Т. 45. С. 391–454.
187. Kain S.R. *Drug. Discov. Today.* 1999. V. 4. № 7. P. 304–312.
188. Taylor D.I., Woo E.S., Giuliano K.A. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2001. V. 12. № 1. P. 75–81.
189. Shinbrot E., Spencer C., Natale V., Kain S.R. *Meth. Enzymol.* 2000. V. 327. P. 513–522.
190. Belmont A.S. *Trends Cell. Biol.* 2001. V. 11. № 6. P. 250–257.
191. Matus A. *Trends Cell. Biol.* 1999. V. 9. № 2. P. 43.
192. Matus A. *Trends Cell. Biol.* 2001. V. 11. № 5. P. 183.
193. *Green Fluorescent Protein in Methods in Enzymology* (Conn P.M., ed.) 1999. Academic Press, New York. V. 302. P. 11–449.
194. *Green Fluorescent Protein in Methods in Cell Biology* (Sullivan K.F., Kay S.A., eds.) 1999. Academic Press, New York/ V. 58. P. 1–367.
195. Matz M.V., Fradkov A.F., Labas Y.A., Savitsky A.P., Zarsisky A.G., Markelov M.L., Lukyanov S.A. *Nat. Biotechnol.* 1999/ V. 17. P. 969–973.
196. Lukyanov K.A., Fradkov A.F., Gurskaya N.G., Matz M.V., Labas Y.A., Savitsky A.P., Markelov M.L., Zarsisky A.G., Zhao X., Fang Y., Tan W., Lukyanov S.A. *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 25879–25882.
197. Verkhusha V.V., Lukyanov K.A. *Nat. Biotechnol.* 2004. V. 22. P. 289–296.
198. Yanushevich Y.G., Staroverov D.B., Savitsky A.P., Fradkov A.F., Gurskaya N.G., Bulina M.E., Lukyanov K.A., Lukyanov S.A. *FEBS Lett.* 2002. V. 511. P. 11–14.
199. Jakubowski H. *J. Nutr.* 2000. V. 130. 2S Suppl. P. 377S–381S.
200. Perla-Kajan J., Twardowski T., Jakubowski H. *Amino Acids.* 2007. V. 32. № 4. P. 561–572.
201. Jakubowski H. *J. Nutr.* 2006. V. 136. 6S Suppl. P. 1741S–1749S.
202. Jakubowski H. *Cell. Mol. Life Sci.* 2004. V. 61. № 4. P. 470–487.
203. Jakubowski H. *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 34. P. 30425–30428.
204. Jakubowski H. *J. Clin. Chem. Lab. Med.* 2005. V. 41. № 10. P. 1011–1014.
205. Gerasimova Y.V., Knorre D.G., Shakirov M.M., Godovikova T.S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008. V. 18. №16. P. 5396–5398.
206. Jakubowski H., Zhang L., Bardeguex A., Aviv A. *Circ. Res.* 2000. V. 87. № 1. P. 45–51.
207. Jakubowski H. *FASEB J.* 1999. V. 13. №15. P. 2277–2283.
208. Glowacki R., Jakubowski H. *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 2. P. 10864–10871.
209. Sikora M., Marczak L., Stobiecki M., Twardowski T., Jakubowski H. *FEBS J.* 2007. V. 274. (supplement 1) P. 295.
210. Glushchenko A. V., Jacobsen D. W. *Antioxid. Redox Signal.* 2007. V. 9. P. 1883–1898.
211. Wright H.T. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1991. V. 26. №1. P. 1–52.
212. Robinson N.E., Robinson A.B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. № 22. P. 12409–12413.
213. Wakankar A. A., Borchardt R.T. *J. Pharm. Sci.* 2006. V. 95. P. 2321–2336.
214. Powell B.S., Enama J.T., Ribot W.J., Webster W., Little S., Hoover T., Adamovicz J.J., Andrews G.P. *Proteins.* 2007. V. 68. № 2. P. 458–479.
215. Catak S., Monard G., Aviyente V., Ruiz-Lopez M.F. *J. Phys. Chem. A.* 2006. V. 110. № 27. P. 8354–8365.
216. Reissner K.J., Aswad D.W. *Cell. Mol. Life Sci.* 2003. V. 60. № 7. P. 1281–1295.
217. Aswad D.W., Paranandi M.V., Schurter B.T. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2000. V. 21. № 6. P. 1129–1136.
218. Takata T., Oxford J.T., Brandon T.R., Lampi K.J. *Biochemistry.* 2007. V. 46. № 30. P. 8861–8871.
219. Hasegawa M., Morishima-Kawashima M., Takio K., Suzuki M., Titani K., Ihara Y. *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. № 24. P. 17047–17054.
220. Doyle H.A., Gee R.J., Mamula M.J. *J. Immunol.* 2003. V. 171. № 6. P. 2840–2847.
221. Weber D.J., McFadden P.N., Caughey B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998. V. 246. № 3. P. 606–608.
222. Sandmeier E., Hunziker P., Kunz B., Sack R., Christen P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999. V. 261. № 3. P. 578–583.
223. Robinson A.B., McKerrow J.H., Cary P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1970. V. 66. № 3. P. 753–757.
224. Robinson N.E., Robinson A.B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. № 3. P. 944–949.
225. Schmidt G., Sehr P., Wilm M., Selzer J., Mann M., Aktories K. *Nature.* 1997. V. 387. № 6634. P. 725–729.
226. Hoffmann C., Schmidt G. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 2004. V. 152. P. 49–63.
227. McNichol B.A., Rasmussen S.B., Carvalho H.M., Meysick K.C., O'Brien A.D. *Infect. Immun.* 2007. V. 75. № 11. P. 5095–5104.
228. Jank T., Pack U., Giesemann T., Schmidt G., Aktories K. *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 28. P. 19527–19535.
229. Stammaes J., Fleckenstein B., Sollid L.M. *Biochim. Biophys. Acta.* 2008. V. 1784. № 11. P. 1804–1811.
230. Caputo I., D'Amato A., Troncone R., Auricchio S., Esposito C. *Amino Acids.* 2004. V. 26. № 4. P. 381–386.
231. Cardamone J.M. *Int. J. Biol. Macromol.* 2008. V. 42. № 5. P. 413–419.
232. Greenberg C.S., Birckbichler P.J., Rice R.H. *FASEB J.* 1991. V. 5. № 15. P. 3071–3077.
233. Griffin M., Cassadio R., Bergamini C.M. *Biochem. J.* 2002. V. 368. Pt. 2. P. 377–396.



УДК 575.162:575.164: 616-06

# Генетический взгляд на феномен сочетанных заболеваний человека

В.П. Пузырев\*, М.Б. Фрейдин

Научно-исследовательский институт медицинской генетики Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, 634050, Томск, ул. Набережная реки Ушайки, 10

\*E-mail: valery.puzirev@medgenetics.ru

**РЕФЕРАТ** Феномен полипатии был обозначен в качестве самостоятельного объекта исследований французскими клиницистами в рамках учения об «артритизме» в конце XIX в. В первой половине XX в. немецкие ученые выделяли «синтропии», т.е. сочетания заболеваний со сходными патофизиологическими механизмами, и «дистропии», т.е. болезни, которые редко наблюдаются совместно у одного пациента. В данной статье синтропия и дистропия определяются как общий и неслучайный естественный феномен, имеющий эволюционно-генетическую основу. Гены, которые участвуют в развитии синтропии, называются синтропными, если же гены совместно участвуют в патофизиологическом механизме заболевания и в то же время препятствуют одновременному проявлению определенных фенотипов, то они называются дистропными. В данной работе уделяется внимание генетической природе этого феномена. Для того чтобы найти синтропные гены, как это будет показано для сердечно-сосудистых заболеваний в качестве примера, можно воспользоваться базой данных общего доступа HuGENet.

**Ключевые слова:** синтропия, дистропия, синтропные и дистропные гены, геном, феном, HuGENet.

## ВВЕДЕНИЕ

Глобальные эпидемиологические исследования заболеваний человека в последние годы дали множество результатов, среди которых есть три важнейших наблюдения, связанных с полипатией и феноменом полиморбидности, т.е. с ситуациями, когда пациент одновременно страдает несколькими заболеваниями. Во-первых, всего лишь 30 хронических мультифакториальных заболеваний составляют 65 % всех болезней, которыми страдает человек, с учетом заболеваемости и смертности в современных популяциях [1]. В западно-европейских популяциях риск пострадать от такого заболевания на протяжении жизни составляет около 60 % [2]. Во-вторых, полипатия весьма характерна для клинической картины у современных пациентов. У пациентов старше 65 лет зачастую наблюдается более 10 близкородственных заболеваний; совместное протекание болезней чаще встречается у женщин, чем у мужчин, во всех возрастных группах [3]. И наконец, генетико-эпидемиологические исследования частых мультифакториальных заболеваний указывают на то, что в их появлении и развитии существенную роль играют наследственные факторы. Роль генетических или наследственных факторов может быть различной, но даже при низких уровнях наследуемости ( $h^2 = 20-30\%$ ) могут быть идентифицированы генетические факторы, влияющие на подверженность инфекционным агентам, таким как вирусы, бактерии, гельминты и паразиты [4].

## СОЧЕТАННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ: СИНТРОПИЯ И ДИСТРОПИЯ

Термин «полипатия» обозначает различные сочетания заболеваний и синдромов у одного пациента, включая слу-

чайно возникшие состояния (травмы, ятрогенные болезни и т.д.). Однако существуют особые случаи полипатии, которые объединены под общим названием «синтропии», предложенным немецкими педиатрами М. Pfaundler и L. von Seht. Они определили синтропию как «взаимную склонность и притяжение» двух заболеваний, а «взаимное отталкивание» они назвали дистропией [5]. По мнению тех же авторов, любой синдром может рассматриваться в качестве синтропии, поскольку он подразумевает селективное сродство тех признаков, из которых он состоит. Еще одна особенность общности патологических состояний – это синхрония, т.е. одновременное появление двух заболеваний.

В качестве доказательства концепции синтропии Pfaundler и von Seht собрали и проанализировали около 30 тыс. историй болезней детей начиная с 1906 г. Они ввели индекс синтропии (S), который характеризовал, насколько чаще встречается наблюдаемое сочетание болезней, чем это ожидается с учетом случайных совпадений. В результате они нашли множество случаев синтропий с высоким S индексом, включая такие пары, как «врожденная болезнь сердца – ревматизм суставов» ( $S = 58.55$ ); «психопатия – энурез» ( $S = 15.31$ ); «гипертиреоз – нефропатия» ( $S = 4.94$ ) и «нефрит – экссудативная эритема» ( $S = 4.59$ ).

В последние годы было опубликовано несколько работ, в которых сходная идея была проверена и подтверждена с использованием современных методов статистики [6–8]. В этих работах ясно продемонстрированы случаи учащенного или более редкого, по сравнению со случайным, существования некоторых заболеваний.

На самом деле, полипатия привлекала интерес исследователей еще раньше, так, в XIX в. французский клиницист

Шарль Бушар ввел концепцию «артритизма», которую он определил как специфическую подверженность группе заболеваний, возникающих у пациента и членов его семьи, отдельно или в различных сочетаниях [9]. По мнению автора данной концепции, эти заболевания имели сходный фундаментальный эффект на метаболизм, а именно его замедление (брадитрофия).

Наряду с синтропными взаимодействиями между болезнями описаны и антагонистические, т.н. «дистропные» заболевания. Примерами дистропных заболеваний служат легочный туберкулез и митральный стеноз, сахарный диабет I типа и язва желудка, лимфопролиферативные и миелопролиферативные процессы [3], туберкулез легких и бронхиальная астма [9].

Известно множество хорошо изученных синтропных заболеваний, например сердечно-сосудистые заболевания [10, 11]; иммуно-зависимые болезни (аллергические заболевания, аутоиммунные болезни) [12–14]; эндокринные заболевания, в т.ч. сочетание сахарного диабета, аутоиммунного тиреоидита и глютеновой энтеропатии [15, 16]; психиатрические заболевания, в т.ч. большие депрессивные расстройства и биполярные расстройства [17], наркомания и другие зависимости [18, 19].

Для того чтобы оценить роль генетики в синтропии, мы должны вернуться к определению: синтропия – это природный общий неслучайный феномен, имеющий эволюционную и генетическую основу, при котором у пациента или у его ближайших родственников одновременно проявляются два или более патологических состояния [20]. Синтропии являются лишь частью известных полипатий. Они включают в себя этиологически и патогенетически связанные сочетания заболеваний, отличающиеся от случайных сочетаний.

Неслучайные сочетания патологий у пациента или его родственников могут ясно свидетельствовать об общих генах, которые влияют на подверженность этим заболеваниям. Генетические исследования многофакторных заболеваний укрепляют уверенность в том, что у таких сочетаний (синтропий) имеется общая генетическая основа, особенно в тех случаях, когда сочетания болезней чаще встречаются в семьях с этими заболеваниями, чем в общей популяции.

В связи с этим мы предположили, что на фоне огромного числа признаков человеческого фенома можно выделить анализируемый массив, который включает большое число взаимосвязанных патологических признаков, синтропий, изучение генетической основы которых может быть очень важным. Гены, кодирующие такие синтропные признаки, называются синтропными генами [20].

### **СИНТРОПНЫЕ ГЕНЫ (ОБЩИЙ ВЗГЛЯД НА ЯВЛЕНИЕ)**

Эпидемиологические исследования комплексных заболеваний человека дают очень убедительные примеры синтропий (континуум сердечно-сосудистых заболеваний, аллергические болезни, аутоиммунные заболевания). Однако для всех синтропий важно выделить группы генов, которые будут определять те или иные патофизиологические пути, а также позволять предсказывать риск синтропии для носителей тех или иных сочетаний генов. Для множества заболеваний и признаков продемонстрирована физическая кластеризация генов предрасположенности в человеческом

геноме [21–23]. Однако синтропные гены не всегда входят в состав кластера сцепленных генов, а, скорее, представляют собой набор функционально взаимодействующих генов, разбросанных по геному, имеющих общую систему регуляции и находящихся под контролем одного и того же биохимического или физиологического регуляторного пути.

Аутоиммунные заболевания были одной из первых групп болезней, которые изучались, исходя из предположения об общности генетических детерминант их развития. В клинической картине аутоиммунных заболеваний много общих признаков, сходны также подходы к терапии, распространенность среди населения, половое соотношение (75 % пациентов с аутоиммунными заболеваниями – лица женского пола) и встречаемость в семьях. К.G. Becker и его соавторы выдвинули гипотезу, что в некоторых случаях клинически различные аутоиммунные заболевания могут находиться под контролем одной и той же группы предрасполагающих генов [21]. Они сравнили данные о сцеплении из 23 опубликованных общегеномных скринингов аутоиммунных и иммуно-зависимых заболеваний человека (рассеянный склероз, болезнь Крона, псориаз, астма, диабет I типа) и животных (экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит, воспалительный артрит крыс, диабет I типа крыс, диабет I типа мышей, индуцированная *Bordetella pertussis* гистаминовая сенситизация, иммунный ответ на экзогенные антигены, системная красная волчанка мышей); также были проанализированы данные скринингов не-аутоиммунных заболеваний (диабет II типа, шизофрения, биполярное расстройство, лептин-зависимое ожирение, гипертензия). Было продемонстрировано, что основная масса (около 65 %) положительных сцеплений для иммуно-зависимых заболеваний человека распадается на 18 четких кластеров, и, кроме того, для различных болезней иммунитета человека имеются перекрывающиеся локусы предрасположенности. Похожая картина наблюдалась и для экспериментальных моделей аутоиммунных заболеваний и болезней иммунитета. Некоторую часть аутоиммунных локусов-кандидатов для разных болезней невозможно было отнести к четким кластерам, и эти единичные локусы, по мнению авторов, могут быть независимыми, специфическими генами предрасположенности, или играть роль в тканевом и органном тропизме, или же просто быть ложноположительными результатами. В контрольной группе не связанных с иммунитетом заболеваний сцепление с аутоиммунными и иммунными кластерами встречалось редко.

Необходимость скринирования «иммунологического генома» для обнаружения генетических основ инфекционных, воспалительных и аутоиммунных заболеваний была заявлена в начале 1990-х годов [24]. Похожая задача стояла перед генетиками и в отношении длительных клинических наблюдений, свидетельствовавших в пользу того, что существуют другие иммунологические синтропии, в т.ч. псориаз, псориазный артрит, атопический дерматит и астма. Однако еще в догеномный период развития науки было показано, что псориаз – это яркий пример Th1-опосредованного заболевания (клеточный иммунитет), контролируемого экспрессией гена IFN- $\gamma$ , в отличие от Th2-опосредованных заболеваний (гуморальный иммунитет), таких как астма, для которых важна экспрессия гена IL-4. Геномные исследова-

дования этих заболеваний подтвердили: астма, по крайней мере отчасти, вызвана иными молекулярно-генетическими механизмами, чем псориаз. На сегодняшний день проведено множество общегеномных исследований на предмет сцепления и несколько геномных ассоциативных скринингов для астмы, и было выявлено несколько генных районов, в т.ч. на хромосомах 2q33, 5q23–31, 6p24–21, 11q12–13, 12q24–12, 13q14–12. С помощью позиционного клонирования было обнаружено 8 новых генов предрасположенности к астме: *ADAM33* (дезинтегрин и металлопротеиназа-33), *DPP10* (дипептидил пептидаза-10), *PHF11* (белок-11 с растительным гомеодоменным пальцем), *GPR110* (G белок-связанный рецептор астмы), *HLA-G* (антиген гистосовместимости), *CYFIP2* (цитоплазматический белок 2, взаимодействующий с белком, кодирующим умственную отсталость при хрупкой X-хромосоме), *IRAKM* (киназа, ассоциированная с рецептором интерлейкина 1), *OPN3* (опсин-3) [25, 26]. Было показано, что локусы, выявленные с помощью геномных скринингов, для астмы и для атопического дерматита редко перекрываются [12, 27]. В то же время общегеномные скрининги на предмет сцепления выявили множество локусов, сцепленных с атопическим дерматитом и псориазом, а также выявили общие локусы предрасположенности для этих болезней на хромосомах 1q21, 3q21, 17q25 and 20p12 [28]. Соответственно, в вышеупомянутой предполагаемой синтропии из четырех предположенных заболеваний астма существенно отличается от трех других болезней по генетическим признакам.

Конечно, данные предположения – это всего лишь изложение общей концепции синтропии и ее генетической основы (синтропные и дистропные гены). Генетическая основа этого феномена, как уже было отмечено, должна быть исследована с использованием современных методов молекулярной биологии и генетики, функциональной геномики и биоинформатики. Такие концепции должны послужить подспорьем для выявления генетической основы известных мультифакториальных заболеваний человека.

Похожая концепция взаимосвязанной сети заболеваний была высказана и протестирована в недавнем исследовании Rzhetsky A. et al. [7]. Они проанализировали 1.5 миллиона историй болезни с 161 заболеванием и предложили подход, который позволил оценить величину генетического перекрытия между этими заболеваниями. Основываясь на полученных результатах, Rzhetsky A. и его соавторы заключили, что «фенотипы заболеваний образуют в высшей степени связную сеть сильных парных корреляций» и предположили, что это можно немедленно начать использовать в ходе исследований, связанных с генетическим картированием, включающих множество на первый взгляд несвязанных фенотипов.

### СИНТРОПНЫЕ ГЕНЫ ЗАБОЛЕВАНИЙ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОГО КONTИНУУМА

Основываясь на введенных понятиях и определениях, мы попытаемся определить синтропные гены для хорошо изученной группы синтропных заболеваний – болезней сердечно-сосудистого континуума (ССК), в т.ч. для коронарной болезни (КБ), артериальной гипертензии (АГ), инсульта, метаболического синдрома (МС), дислипидемии (ДЛ), ожирения и инсулин-независимого сахарного диабета (ИНСД).

Понятие ССК было впервые введено в 1991 г. [10] По этой теории сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) представляют собой последовательную цепь событий, определяемых множеством связанных и несвязанных факторов риска, развивающихся по множеству физиологических и метаболических механизмов и в итоге приводящих к развитию финальных стадий заболеваний сердца. Участники континуума (заболевания и симптомы) перекрываются и взаимодействуют друг с другом путем единичных и тандемных событий по ходу прогрессии ССЗ [10, 11]. В данном контексте мы и относим эту группу патологических состояний к синтропиям.

Мы воспользовались общедоступным исследовательским ресурсом HuGE Navigator, чтобы выявить гены, участвующие в развитии семи болезней, относящихся к ССК (сокращения обозначены выше). Ресурс HuGE Navigator дает доступ к постоянно обновляемой базе данных по эпидемиологии человека, в которой также содержатся данные по популяционной встречаемости генетических вариантов, связям болезнь-ген, взаимодействиям между генами и окружающей средой, а также результаты генетических тестов. Этот ресурс обеспечивается Эпидемиологической сетью генома человека (Human Genome Epidemiology Network (HuGENet™)), добровольной международной коллаборацией, которая имеет целью оценивать влияние изменений генома человека на здоровье и ход болезней на популяционном уровне. С 2001 г. HuGENet™ поддерживает базу данных опубликованных популяционных эпидемиологических исследований, которые индексируются и обрабатываются базой данных PubMed [29].

По данным базы HuGENet, число генов, изученных на данный момент в связи с семью исследуемыми ССЗ, варьировало от 162 для ДЛ до 466 для АГ. HuGE Navigator ранжирует эти гены в соответствии с соотношением между числом исследований, давших положительный результат для данной ассоциации, и общим числом опубликованных на эту тему работ.

Чтобы придать большую значимость связи между генами и болезнью, мы учитывали только те гены, для которых этот показатель был больше или равен 0.01. Максимальные показатели для различных генов, ассоциированных с изучаемыми болезнями, были 4.1 для ДЛ, 1.60 для КБ, 1.12 для АГ, 1.02 для инсульта, 1.01 для МС, 0.74 для ожирения и 0.36 для ИНСД.

Был обнаружен 21 ген, ассоциированный со всеми ССК-заболеваниями (табл. 1). Конечно, число генов, связанных с любой конкретной болезнью, включаемой в ССК-синтропию, намного больше. Однако если говорить обо всей ССК-синтропии в целом, то, по данным HuGENet и при принятых нами критериях, только этот 21 ген можно считать контролирующим развитие и структуру ССК-синтропии, и эти гены можно называть синтропными генами ССК. Особого внимания заслуживают два факта. Во-первых, большая часть этих генов хорошо изучена и изучается в течение многих лет. Во-вторых, они обуславливают генетическую основу патофизиологического континуума механизмов, участвующих в данной синтропной группе заболеваний, включая нарушения липидного метаболизма, ренин-ангиотензин-альдостероновую систе-

Таблица 1. Синтропные гены для континуума сердечно-сосудистых заболеваний

Порядковый номер	Обозначение гена	Продукт гена	Хромосомная локализация
1	ABCA1	АТФ-связывающий кассетный транспортер 1 (ATP-binding cassette transporter 1)	9q22-q21
2	ACE	Ангиотензин I-превращающий фермент (Angiotensin I-converting enzyme)	17q23
3	ADIPOQ	Адипоцит-специфический секреторный белок (Adipocyte-specific secretory protein)	3q27
4	ADRB2	$\beta_2$ -адренергический рецептор ( $\beta_2$ -adrenergic receptor)	5q32-q34
5	AGT	Ангиотензиноген (Angiotensinogen)	1q42-q43
6	AGTR1	Ангиотензиновый рецептор 1 (Angiotensin receptor 1)	3q21-q25
7	APOA1	Аполипопротеин А1 (Apolipoprotein A1)	11q23
8	APOE	Аполипопротеин Е (Apolipoprotein E)	19q13.2
9	CETP	Транспортный белок холистерилового эфира (Cholesteryl ester transfer protein)	16q21
10	ESR1	Эстрогеновый рецептор 1 (Estrogen receptor 1)	6q25.1
11	GNB3	Бета-3 G-связывающий белок (Beta-3 G-binding protein)	12p13
12	IL6	Интерлейкин-6 (Interleukin-6)	7p21
13	LIPC	Печеночная липаза С (Hepatic lipase C)	15q21-q23
14	LPL	Лipoproteиновая липаза (Lipoprotein lipase)	8p22
15	LTA	Лимфотоксин- $\alpha$ (Lymphotoxin- $\alpha$ )	6p21.3
16	MTHFR	Метилентетрагидрофолат редуктаза (Methylenetetrahydrofolate reductase)	1p36.3
17	NOS3	Эндотелиальная NO-синтаза (Endotelial NO-synthase)	7q36
18	PPARG	Рецептор- $\gamma$ активируемый пероксисомным пролифератором (Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ )	3p25
19	SERPINE1	Ингибитор 1 активатора плазминогена (Plasminogen activator inhibitor 1)	7q21.3-q22
20	SELE	Селектин Е (Selectin E)	1q23-q25
21	TNF	Фактор некроза опухолей $\alpha$ (Tumor necrosis factor- $\alpha$ )	6p21.3

му, симпатoadрениалиновую систему, процессы воспаления и работу эндотелия.

Результаты исследований генетических ассоциаций (genetic association studies (GAS)) довольно противоречивы из-за гетерогенности выборок (этническое разнообразие, возрастные и половые различия), небольшого размера выборок (данные масштабных исследований стали появляться только недавно), нечетких клинических критериев при формировании группы больных. С учетом этого принято считать, что GAS должны сопровождаться мета-анализом, а также полногеномными ассоциативными исследованиями (genome-wide association studies (GWASs)). Эти факторы были учтены при создании HuGENet, где гены, упоминаемые в GWAS и работах по мета-анализу, получают повышающие коэффициенты.

В базе HuGENet была найдена 91 работа по мета-анализу для 21 гена и 7 болезней. Показатели различаются для разных болезней, и максимальные значения были получены для генов *MTHFR* и *APOE* (18 и 13 работ, соответственно). Для генов *SELE*, *ESR1*, и *SERPINE1* пока не было проведено работ по мета-анализу. Среди изучаемых болезней чаще всего выполнялся мета-анализ следующих: КБ, инсульт, АГ и ожирение – 28, 21, 17 и 13 работ, соответственно.

Во время выполнения данной работы в HuGENet было найдено 13 работ по мета-анализу гена *APOE*, КБ и инсульта. Новейшие исследования [30] охватили 203 работы, вы-

полненные с 1970 по 2007 г., и предоставили окончательные доказательства существенной связи генетических вариантов гена *APOE* с КБ и инсультом. Для носителей аллеля E4 риск развития КБ на 20 % выше, чем для людей без такового, а уровни холестерина в липопротеине низкой плотности возрастают в следующем ряду (по наличию аллелей гена *APOE*): E2/E2, E2/E3, E2/E4, E3/E3, E3/E4, E4/E4. Показатель отношения шансов OR (odds ratio) для развития КБ у носителей аллеля E4 равен 1.06 (95 % CI 0.99-1.13). В обзоре, охватившем 500 работ [31], была отмечена прямая и ясная ассоциация между *APOE* и инсультом у азиатов (китайцев, японцев и корейцев), но такой связи не было выявлено у европейцев. Также была подтверждена связь между инсультом и другими генами (*ACE I/D*, *MTHFR 677C/T*). Таким образом, три фенотипа ССК-синтропии связаны с *APOE*, и эта связь подтверждается результатами мета-анализа.

Ген *MTHFR* и его полиморфный вариант C677T также были проверены с помощью мета-анализа на предмет ассоциации с пятью ССК-фенотипами (КБ, АГ, инсульт, ИНСД, ожирение). В пользу такой ассоциации говорит больше работ [32–36], чем против нее [37]. Важно, что полиморфизм *MTHFR* является независимым фактором риска для АГ [38].

Ассоциация гена *ACE* с ССЗ изучалась в течение долгого времени, и накоплена масса данных. Однако мета-анализ гена и данной группы заболеваний был начат только не-

давно. В базе HuGENet имеется 7 публикаций на эту тему. Мета-анализ 118 исследований I/D полиморфизма гена *ACE* подтвердил ассоциацию КБ и ИНСД [39]; однако наряду с этим имеются результаты мета-анализа, которые не подтверждают эту ассоциацию [36, 40]. Мета-анализ другого гена ренин-ангиотензиновой системы, *AGT*, показал достоверную ассоциацию между полиморфизмом M235T и КБ, АГ, ожирением и инсультом. Во всех случаях 235T/Т генотип был ассоциирован с повышенным риском заболевания [41, 42].

Для ассоциации гена *LPL* и ССЗ результаты мета-анализа носят противоречивый характер. Имеется 7 примеров такого анализа, где изучено несколько случаев независимого множественного полиморфизма в этом гене. Результаты одного исследования идентифицировали ассоциацию между мутацией Asn291Ser и КБ, ИНСД и ДЛ (гипертриглицеридемия и низкий уровень холестерина в липопротеинах высокой плотности) [43]. Также опубликованы результаты мета-анализа, которые впервые показали взаимодействие между генами *APOE* и *LPL* [44]. В этом исследовании было установлено значение OR 2.2 для инсульта и развития разрыва миокарда для пациентов, одновременно имеющих *APOE\*E4* и *LPL\*447X* (*S447X* полиморфизм) ( $p = 0.01$ ).

Три гена, необходимые для развития воспаления, оказались также важными для ССК-синтропии, это были гены *IL6*, *TNF* и *LTA*. Для гена *LTA* было сделано только одно мета-аналитическое исследование (для КБ); однако для генов *IL6* и *TNF*, 5 и 7 мета-аналитических исследований, соответственно, цитируется в HuGENet. Мета-анализ *IL6* был проведен на предмет ассоциации с ИНСД и КБ, и было подтверждено отсутствие такой ассоциации [45–47]. Для гена *TNF* был проведен мета-анализ всех заболеваний, вовлеченных в ССК-синтропию, за исключением ДЛ. Анализ 31 исследования метаболического синдрома и -308G/A полиморфизма гена *TNF* показал, что -308A аллель связан с 23 %-ным риском ожирения; также было показано существенное увеличение уровня систолического давления и уровня инсулина в плазме [48]. Тот же полиморфизм показал стабильную ассоциацию с КБ и инсультом в азиатской популяции: для пациентов с генотипом -308G/G риск инсульта был на 40 % меньше, чем для пациентов с другими генотипами [49].

Для других синтропных генов и фенотипов ССК имеются только единичные примеры мета-аналитических исследований, и дальнейшие исследования с помощью этого метода являются крайне необходимыми.

Основываясь на информации о генах, которые встречаются или не встречаются вместе, мы провели иерархический кластерный анализ болезней синтропной группы ССК, чтобы установить их возможные генные взаимоотношения. Было обнаружено два плотных кластера: один состоял из АГ, КБ, инсульта и ДЛ, а другой из МС, ожирения и ИНСД (рис. 1).

Кажется рациональным, что АГ, КБ, инсульт и ДЛ образуют плотный кластер, из-за того что имеют общие гены предрасположенности. Это было доказано в работе Dzaou V. с соавт. [11], где они ввели понятие ССК. Для этих четырех компонентов ССК было показано перекрытие основных регуляторных путей при развитии фенотипа (липидного

метаболизма, ренин-ангиотензин-альдостерон и адренергической системы, окислительного стресса и эндотелиальной дисфункции) [34, 41].

Однако МС, ожирение и ИНСД имеют как общие, так и специфические черты в патогенезе. Их общей чертой является использование инсулинового метаболизма как основного пути регуляции. Несмотря на это, МС отличается гиперинсулинемией и инсулиновой резистентностью, в то время как ИНСД характеризуется нарушением функции клеток поджелудочной железы и инсулиновой резистентностью [50, 51]. Эти отличительные черты могут быть связаны с взаимоотношениями между МС, ИНСД, ожирением и другими исследованными ССЗ, которые и отражаются в кластерной диаграмме.

Подход, предлагаемый выше, принципиально может быть применен к любой синтропной группе заболеваний. Может быть интересным проанализировать генетические кластеры в пределах всего многообразия заболеваний человека с целью формирования естественной генетической системы для их классификации.

Похожий подход недавно был использован Toktamani A. с соавт. [8], которые показали высокий уровень корреляции между SNP (single nucleotide polymorphism, однонуклеотидный полиморфизм), значимыми в GWAS для КБ, АГ и ИНСД, а также для биполярных расстройств (БР) и ряда иммуно-зависимых заболеваний. В частности, было показано, что среди 1000 наиболее значимых SNP (статистическая значимость по ассоциации с заболеванием) имеются 57 общих для КБ и ИНСД, 81 общих для АГ и ИНСД и 63 общих для АГ и КБ. Эти генетические корреляции между заболеваниями были высоко значимыми. Также была обнаружена сильная корреляция между аутоиммун-

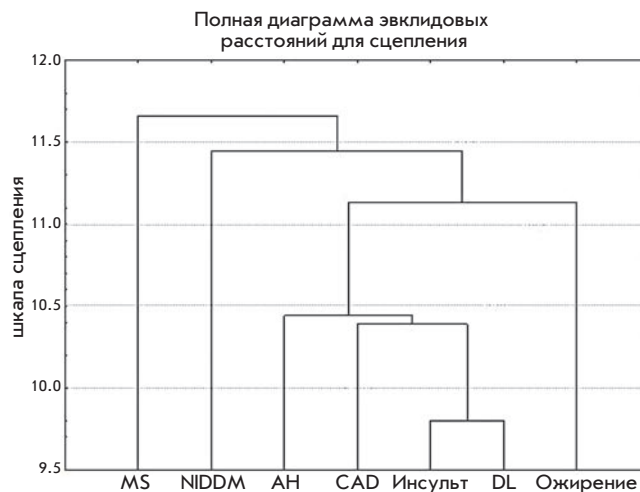


Рис. 1. Дендрограмма кластеров, обнаруженных среди членов континуума сердечно-сосудистых заболеваний, основанная на количестве общих/не общих генов, ассоциированных с этими заболеваниями. Условные обозначения: MS – метаболический синдром; NIDDM – инсулин-независимый сахарный диабет; АН – артериальная гипертензия; CAD – коронарная болезнь; DL – дислипидемия

ными заболеваниями, такими как ревматоидный артрит и инсулин-зависимый диабет. Интересно, что была обнаружена сильная генетическая корреляция БР, КБ и ИНСД, а также между АГ и болезнью Крона, на первый взгляд несвязанными заболеваниями. Это позволяет предполагать существование каких-то неожиданных связей между этими заболеваниями и дает аргументы в пользу подхода, основанного на генетических корреляциях, для построения естественной классификации болезней.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

«Феном» по аналогии с термином «геном» определяется как точное фенотипическое представление о виде [52]. Оно включает морфологические, биохимические, физиологические и онтогенетические характеристики организма. Феномика пытается определить степень вариабельности в феноме, однако это сталкивается с большими трудностями. То, как выглядит патологический фенотип с точки зрения неслучайного сочетания патологических признаков (синтропии), не соответствует клинической традиции придавать центральное значение конкретному диагнозу, нозологии. В синтропном подходе из бесконечного количества признаков фенома выбираются взаимосвязанные признаки, контролируемые общими генами. Путь к открытию таких синтропных генов не отличается существенным образом от обычного генетического анализа любого менделевского признака. Однако для получения более надежных данных в связи ген-фен потребуются существенно большие выборки. Более того, унификация (стандартизация) фенотипа является критической и очень трудоемкой задачей, которая зависит от клиницистов и эпидемиологов, вовлеченных в текущие эпидемиологические исследования в различных районах мира.

В этом отношении также необходимо отметить хорошо известный феномен плейотропного действия гена, т.е. множество фенотипических эффектов одного гена. Ряд недавних публикаций обсуждает эту проблему применительно к заболеваниям человека и выдвигает идею, сходную с концепцией синтропии [53, 54]. По-видимому, плейотропность является одним из базовых факторов в развитии синтропии. Сумма плейотропных эффектов гена формирует физиологическую область его действия, которая может быть описана как генная сеть или, в более общем смысле, биологическая сеть. Перекрытие полей действия разных генов формирует мета-поле, которое служит основой для раз-

вития группы заболеваний, связанных с действием этих генов. Учитывая общую генетическую основу, связанную с взаимодействием ограниченного числа генов, эти заболевания имеют тенденцию группироваться вместе, формируя синтропную группу. В то же время эти заболевания фенотипически различимы, поскольку различные части мета-поля действия гена будут иметь решающее значение для разных заболеваний.

В настоящее время прогнозируется увеличение числа исследований генетических ассоциаций как для генов-кандидатов, так и на основе GWAS [39]. Эти прогнозы связаны с большей доступностью картированных SNP, успешным завершением проекта НарМар, развитием микрочиповых технологий генотипирования и эволюцией статистических и биоинформационных методов. Однако поиск генетических маркеров риска сложных заболеваний не настолько прямолинеен, как детекция фенотипических маркеров, используемых в настоящее время в клинической практике [55].

В действительности OR, приписываемый большинству аллелей, ассоциированных со сложными заболеваниями, как в GAS, так и GWAS редко достигает значений 1.15–1.50. Обычно обнаруживаются даже более слабые ассоциации, применимость которых в клинической практике оценивается как низкая [55]. Однако нельзя исключить, что слабые эффекты являются следствием генетической и фенотипической гетерогенности исследуемых популяций, где также имеются индивидуумы с более сильными эффектами соответствующих генов. Принимая это во внимание, был предложен более целенаправленный подход к организации исследований, который должен помочь обнаружить более сильные и значимые ассоциации аллелей с патологическими фенотипами, например у более молодых пациентов, или среди лиц с явной семейной кластеризацией, или у пациентов, часто подвергающихся госпитализации [56]. По нашему мнению, анализ общих генов для данной синтропной группы дает возможность для такого целенаправленного исследования, которое может быть полезным для открытия генов с сильными эффектами и ранжирования их по эффекту в отношении патофизиологического континуума. ●

*Работа частично поддержана РФФИ  
(грант 07-04-01613, 07-04-01526, 08-04-01814).*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Czeizel A. The baseline data of the Hungarian Congenital Malformation Register, 1970–1976. // Acta Paediatr Acad Sci Hung. 1978. V. 19. P. 149–156.
- Baird P.A., Anderson T.W., Newcombe H.B., Lowry R.B. Genetic studies in children and young adults: population study. // Am. J. Hum. Genet. 1988. V. 42. P. 677–693.
- Крылов А.А. К проблеме сочетаемости заболеваний. // Клини. мед. 2000. Т. 78. С. 56–58.
- Hill A.V.S. Aspects of genetic susceptibility to human infectious diseases. // Annu Rev. Genet. 2006. V. 40. P. 469–486.
- Pfaundler M., von Seht L. Weiteres über Syntropie kindlicher Krankheitszustände. // Z Kinderheilkd. 1921. V. 30. P. 298–313.
- Williams F.M.K., Cherkas L.F., Spector T.D., MacGregor A.J. A common genetic factor underlines hypertension and other cardiovascular disorders. // BMC Cardiovascular Disorders. 2004. V. 4. P. 20.
- Rzhetsky A., Wajngurt D., Park N., Zheng T. Probing genetic overlap among complex human phenotypes. // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 2008. V. 104. P. 11694–11699.
- Torkamani A., Topol E.J., Schork N.J. Pathway analysis of seven common diseases assessed by genome-wide association. // Genomics. 2008. V. 92. P. 265–272.
- Bouchard Ch. Lecons sur les maladies par ralentissement de la nutrition. 1890. Librairie F. Savy, Paris.
- Dzau V.J., Braundwald E. Resolved and unresolved issues in the prevention and treatment of coronary artery disease: a workshop consensus statement. // Am. Heart J. 1991. V. 121. P. 1244–1263.
- Dzau V.J., Antman E.M., Black H.R. et al. The cardiovascular disease continuum validated: clinical evidence of improved patient outcomes: part I: Pathophysiology and clinical trial evidence (risk factors through stable coronary artery disease). // Circulation. 2006. V. 114. P. 2850–2870.
- Cookson W. The immunogenetics of asthma and eczema: a new focus on the epithelium. // Nat. Rev. Immunol. 2004. V. 4. P. 978–988.
- Gregersen P.K., Behrens T.W. Genetics of autoimmune diseases—disorders of immune homeostasis. // Nat. Rev. Genet. 2006. V. 7. P. 917–928.
- Wellcome Trust Case Control Consortium & The Australo-Anglo-American Spon-

- dylitis Consortium. Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. // *Nat. Genet.* 2007. V. 39. P. 1329–1337.
15. Hanukoglu A., Mizrahi A., Dalal I. et al. Extraprostatic autoimmune manifestations in type 1 diabetes patients and their first-degree relatives. // *Diabetes Care.* 2003. V. 26. P. 1235–1240.
  16. Doolan A., Donaghue K., Fairchild J., Wong M., Williams A.J. Use of HLA typing in diagnosing celiac disease in patients with type 1 diabetes. // *Diabetes Care.* 2005. V. 28. P. 806–809.
  17. Harvey M., Belleau P., Barden N. Gene interactions in depression: pathways out of darkness. // *Trends Genet.* 2007. V. 23. P. 547–556.
  18. Decker K.P., Ries R.K. Differential diagnosis and psychopharmacology of dual disorders. // *Psychiatr. Clin. North. Am.* 1993. V. 16. P. 703–718.
  19. Li M.D., Burmeister M. New insights into the genetics of addiction. // *Nat. Rev. Genet.* 2009. V. 10. P. 225–231.
  20. Пузырев В.П. Геномные исследования в генетической кардиологии: состояние и перспективы. // *Вестн. РАМН.* 2000. № 7. С. 28–33.
  21. Becker K.G., Simon R.M., Bailey-Wilson J.E. et al. Clustering of non-major histocompatibility complex susceptibility candidate loci in human autoimmune diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 1998. V. 95. P. 9979–9984.
  22. Niehrs C., Pollet N. Synexpression groups in eukaryotes. // *Nature.* 1999. V. 402. P. 483–487.
  23. Brunner H.G., van Driel M.A. From syndrome families to functional genomics. // *Nat. Rev. Genet.* 2004. V. 5. P. 545–551.
  24. Eppel J.T. On genetic components in autoimmunity: a critical review based on evolutionarily oriented rationality. // *Hum. Genet.* 1992. V. 90. P. 331–341.
  25. Moffatt M.F. Genes in asthma: new genes and new ways. // *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2008. V. 8. P. 411–417.
  26. Postma D.S., Koppelman G.H. Genetics of asthma: where are we and where do we go? // *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2009. V. 6. P. 283–287.
  27. Bowcock A.M. The genetics of psoriasis and autoimmunity. // *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2005. V. 6. P. 93–122.
  28. Bowcock A.M., Cookson W.O.C.M. The genetics of psoriasis, psoriatic arthritis, and atopic dermatitis. // *Hum. Mol. Genet.* 2004. V. 13. Spec. № 1. P. 43–55.
  29. Yu W., Gwinn M., Clyne M., Yesupriya A., Khoury M.J. A Navigator for Human Genome epidemiology. // *Nat. Genet.* 2008. V. 40. P. 124–125.
  30. Bennet A.M., Di Angelantonio E., Ye Z. et al. Association of apolipoprotein E genotypes with lipid levels and coronary risk. // *JAMA.* 2007. V. 298. P. 1300–1311.
  31. Ariyaratnam R., Casas J.P., Whittaker J. et al. Genetics of ischaemic stroke among persons of non-European descent: a meta-analysis of eight genes involving approximately 32,500 individuals. // *PLoS Med.* 2007. V. 4. P. 131.
  32. Wu A.H., Tsongalis G.J. Correlation of polymorphisms to coagulation and biochemical risk factors for cardiovascular diseases. // *Am. J. Cardiol.* 2001. V. 87. P. 1361–1366.
  33. Klerk M., Verhoef P., Clarke R. et al. MTHFR Studies Collaboration Group; MTHFR 677C ->T polymorphisms and risk of coronary heart disease: a meta-analysis. // *JAMA.* 2002. V. 288. P. 2023–2031.
  34. Casas J.P., Hingorani A.D., Bautista L.E., Sharma P. Meta-analysis of genetic studies in ischemic stroke: thirty-two genes involving approximately 18,000 cases and 58,000 controls. // *Arch. Neurol.* 2004. V. 61. P. 1652–1661.
  35. Zintzaras E., Chatzoulis D.Z., Karabatsas C.H., Stefanidis I. The relationship between C677T methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and retinopathy in type 2 diabetes: a meta-analysis. // *J. Hum. Genet.* 2005. V. 50. P. 267–275.
  36. Banerjee I., Gupta V., Ganesh S. Association of gene polymorphism with genetic susceptibility to stroke in Asian population: a meta-analysis. // *J. Hum. Genet.* 2007. V. 52. P. 205–219.
  37. Lewis S.J., Ebrahim S., Smith D.G. Meta-analysis of MTHFR 677C->T polymorphism and coronary heart disease: does totality of evidence support causal role for homocysteine and preventive potential of folate? // *BMJ.* 2005. V. 331. P. 1053.
  38. Qian X., Lu Z., Tan M., Liu H., Lu D. A meta-analysis of association between C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene and hypertension. // *Eur. J. Hum. Genet.* 2007. V. 15. P. 1239–1245.
  39. Zintzaras E., Lau J. Trends in meta-analysis of genetic association studies. // *J. Hum. Genet.* 2008. V. 53. P. 1–9.
  40. Kitsios G., Zintzaras E. Genetic variation associated with ischemic heart failure: a HuGE review and meta-analysis. // *Am. J. Epidemiol.* 2007. V. 166. P. 619–633.
  41. Navarro-Lopez F. Genes and coronary heart disease. // *Rev. Esp. Cardiol.* 2002. V. 55. P. 413–431.
  42. Mondry A., Loh M., Liu P., Nagel M. Polymorphisms of the insertion/deletion ACE and M235T AGT genes and hypertension: surprising new findings and meta-analysis of data. // *BMC. Nephrol.* 2005. V. 6. P. 1.
  43. Hu Y., Lin W., Huang R., Zhang X. A systematic review and meta-analysis of the relationship between lipoprotein lipase Asn 291 Ser variant and diseases. // *J. Lipid. Res.* 2006. V. 47. P. 1908–1914.
  44. Baum L., Ng H.K., Wong K.S. et al. Association of apolipoprotein E exon 4 and lipoprotein lipase S447X polymorphisms with acute ischemic stroke and myocardial infarction. // *Clin. Chem. Lab. Med.* 2006. V. 44. P. 274–281.
  45. Huth C., Heid I.M., Vollmert C. et al. IL6 gene promoter polymorphisms and type 2 diabetes: joint analysis of individual participants' data from 21 studies. // *Diabetes.* 2006. V. 55. P. 2915–2921.
  46. Qi L., van Dam R.M., Meigs J.B. et al. Genetic variation in IL6 gene and type 2 diabetes: tagging-SNP haplotype analysis in large-scale case-control study and meta-analysis. // *Hum. Mol. Genet.* 2006. V. 15. P. 1914–1920.
  47. Sie M.P., Sayed-Tabatabaei F.A., Oei H.H. Interleukin 6 -174 g/c promoter polymorphism and risk of coronary heart disease: results from the Rotterdam study and a meta-analysis. // *Arterioscler. Tromb. Vasc. Biol.* 2006. V. 26. P. 212–217.
  48. Sookoian S.C., Gonzalez C., Pirola C.J. Meta-analysis on the G-308A tumor necrosis factor alpha gene variant and phenotypes associated with the metabolic syndrome. // *Obes. Res.* 2005. V. 13. P. 2122–2131.
  49. Pereira T.V., Rudnicki M., Franco R.F., Pereira A.C., Krieger J.E. Effect of the G-308A polymorphism of tumor necrosis factor alpha gene on the risk of ischemic heart disease and ischemic stroke: a meta-analysis. // *Am. Heart. J.* 2007. V. 153. P. 821–830.
  50. Reaven G.M. The insulin resistance syndrome. // *Curr. Atheroscler. Rep.* 2003. V. 5. P. 364–371.
  51. Eckel R.H., Grundy S.M., Zimmet P.Z. The metabolic syndrome. // *Lancet.* 2005. V. 365. P. 1415–1428.
  52. Freimer N., Sabatti C. The Human phenotype project. // *Nat. Genet.* 2003. V. 34. P. 15–21.
  53. Goh K.-I., Cusick M.E., Valle D. et al. The human disease network. // *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 2007. V. 104. P. 8685–8690.
  54. Tyler A.L., Asselbergs F.W., Williams S., Moore J.H. Shadows of complexity: what biological networks reveal about epistasis and pleiotropy. // *BioEssays.* 2009. V. 31. P. 220–227.
  55. Cambien F., Tiret L. Genetic of cardiovascular diseases. From single mutation to whole genome. // *Circulation.* 2007. V. 116. P. 1714–1724.
  56. Cambien F. About mega-studies, genetics and cardiovascular diseases. In: *Prospects and limitations of very large cohort studies.* Available via GeneCanvas. [http://genecanvas.idf.inserm.fr/readarticle.php?article\\_id=265](http://genecanvas.idf.inserm.fr/readarticle.php?article_id=265). 2006.

УДК 575.174.5

# Достижения и особенности в работе с древней ДНК и ДНК из сложных криминалистических образцов

А.П. Григоренко<sup>1,2</sup>, С.А. Боринская<sup>1</sup>, Н.К. Янковский<sup>1</sup>, Е.И. Рогов<sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup> Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, 119991, Москва, ул. Губкина, 3

<sup>2</sup> Научный центр психического здоровья Российской академии медицинских наук, 115522, Москва, Каширское шоссе, 34

<sup>3</sup> University of Massachusetts Medical School, Worcester, U.S.A.

\*E-mail: rogaev@vigg.ru

**РЕФЕРАТ** Исследования древней ДНК, извлеченной из музейных образцов, археологических и палеонтологических находок, начали развиваться 25 лет назад с определения последовательности нуклеотидов (секвенирования) коротких фрагментов митохондриальной ДНК (мтДНК). Развитие методов экстракции и анализа нуклеиновых кислот позволило перейти к реконструкции полных митохондриальных геномов в древних останках. Это позволило делать заключения не только о самих организмах, вымерших десятки тысяч лет назад, но и об их популяциях и эволюции. Сейчас удается секвенировать участки ядерного генома вымерших организмов (мамонт, неандерталец) и делать заключения об их фенотипических признаках. Исследования древней ДНК стали уникальным инструментом проверки эволюционных гипотез и комплексной реконструкции истории изменений биоты. Особое внимание привлекают исследования ДНК из человеческих останков, позволяющие восстановить историю взаимоотношений различных популяций древних людей. Выявились методические особенности и проблемы, специфичные для работы с древней ДНК. Это сверхмалые количества и фрагментированность ДНК в древних образцах, а также наличие химических модификаций, блокирующих репликацию древней ДНК *in vitro*, либо приводящих к появлению в ней постмортальных мутаций. Те же особенности и проблемы выявились и при анализе ДНК в ряде особо сложных случаев молекулярно-генетической экспертизы криминалистических образцов (необходимость анализа сверхмалых количеств ДНК, загрязненной ДНК или ДНК, разрушенной химическими или термическими воздействиями), что осложняет или делает невозможным получение экспериментальных данных и/или их интерпретацию. Анализ этих проблем и подходы к их разрешению представлены в данном обзоре.

**Ключевые слова:** древняя ДНК, методы, эволюция, ДНК идентификация, криминалистическая экспертиза.

**Список сокращений:** мтДНК – митохондриальная ДНК, пмтДНК – полная последовательность мтДНК, STR – короткие tandemные повторы.

## ВВЕДЕНИЕ

Исследования древней ДНК позволяют проводить эмпирическую проверку эволюционных гипотез и вносят значительный вклад в комплексную реконструкцию истории изменений биоты. Анализ ДНК из археологических образцов останков человека дает возможность получить сведения о генетических особенностях древнего населения различных регионов.

Первые сообщения об исследованиях древней ДНК появились 25 лет назад. Удалось выделить фрагмент ДНК из музейного образца высушенной мускульной ткани квагги – южноафриканского непарнокопытного животного, вымершего в XIX в. Выделенный фрагмент ДНК был клонирован в фаговом векторе и секвенирован. Филогенетический анализ показал, что установленная последовательность фрагмента митохондриальной ДНК (мтДНК) близка к таковой одного из видов зебр [1, 2]. Следующим появилось сообщение о выделении, клонировании и секвенировании фрагмента ДНК из египетской мумии возрастом около 2400 лет [3]. За этими работами последовали попытки выделения ДНК из останков животных, растений и микроорганизмов возрастом от сотен до более миллиона лет (см. обзор в [4]). По мере накопления данных стало ясно, что возраст останков, в которых, согласно расчетам на основе кинетики

разрушения ДНК, могут сохраняться доступные для анализа матрицы, не превышает 0.1–1.0 млн лет, что степень сохранности ДНК зависит от возраста и характера биологического образца, а также в значительной мере от условий, в которых он находился [5, 6]. Сообщения о выделении ДНК из образцов возрастом более миллиона лет являются, по всей видимости, ошибочными. Фрагменты наиболее древних аутентичных ДНК были выделены из останков, найденных в вечной мерзлоте, – мамонт, бизон и другие животные, хлоропластная ДНК растений, бактериальная ДНК [7–12]. При этом удалось выделить фрагменты размером до 900–1000 пар нуклеотидов (п.н.). Низкая температура и низкая влажность способствуют лучшему сохранению ДНК, что позволяет получать пригодные для молекулярно-генетического анализа препараты ДНК из образцов возрастом в десятки тысяч лет (*рис. 1*) [13].

При работе с ДНК, изолированной из древних или исторических образцов, необходимо учитывать ряд методических проблем. К ним относятся сверхмалые количества и небольшие размеры фрагментов ДНК, которые удается выделить из древних образцов, а также наличие в ДНК химических модификаций, блокирующих ее репликацию либо приводящих к появлению постмортальных мутаций в последовательности нуклеотидов.



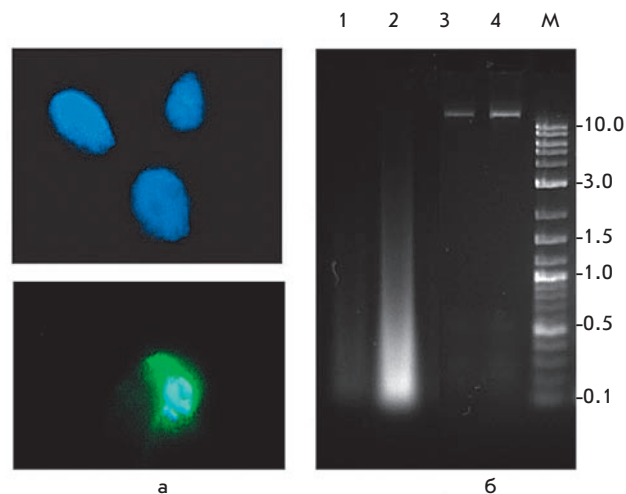
Спонтанные повреждения молекулы ДНК в живой клетке репарируются в процессе репликации или приводят к гибели и элиминации клетки. После гибели целого организма репарация, как и элиминация клеток с поврежденной ДНК, прекращается, что ведет к накоплению химических модификаций в молекуле ДНК и фрагментации молекул ДНК в клетках погибшего организма. Помимо этого ДНК в захороненных останках разрушается организмами почвенной биоты. Из-за деградации древней ДНК контаминация анализируемых образцов даже единичными молекулами современной ДНК ведет к получению ложных результатов.

Появление полимеразной цепной реакции (ПЦР) [14–16] значительно расширило возможности анализа древней ДНК, т.к. позволяет *in vitro* быстро получать множество копий из одной исходной молекулы ДНК. Применение ПЦР позволяет избирательно амплифицировать целевые фрагменты, что особенно важно при исследовании древних образцов, в которых до 99 % ДНК может составлять примесная ДНК из почвенных бактерий и грибов.

Развитие технологий экстракции и секвенирования ДНК в последние несколько лет привело к тому, что от извлечения отдельных коротких фрагментов ДНК удалось перейти к определению полной последовательности митохондриального генома, определению участков ядерного генома, к анализу популяционно-генетического разнообразия вымерших видов и популяций (моа, мамонта, шерстистого носорога, пещерного медведя, бизонов Берингии, гигантского орла, неандертальца и др.) и исследованию изменений экосистем в плейстоцене и голоцене (см. обзоры [4, 17–20]).

За годы исследований был сформулирован ряд требований к условиям работы с древней ДНК и критериев аутентичности получаемых результатов. Контаминация исследуемых образцов современными ДНК остается одной из наиболее важных проблем при анализе древней ДНК. Среди наиболее известных примеров – сообщение о последовательности ДНК, выделенной из кости динозавра [21], которая, как выяснилось при последующем анализе, являлась фрагментом ядерной ДНК человека [22], а также упомянутая выше попытка секвенирования ДНК из египетской мумии [3] – в настоящее время полученная нуклеотидная последовательность рассматривается как результат загрязнения современной человеческой ДНК [17, 23].

При работе с ДНК, изолированной из древних или исторических образцов, необходимо учитывать также возможность появления ошибок в реконструируемых нуклеотидных последовательностях вследствие гидролитической или окислительной модификации древней ДНК. Например, определение нуклеотидных последовательностей протяженных участков ядерного генома одного и того же образца неандертальца было проведено двумя группами. Группа Эдварда Рубина из Объединенного института геномных исследований при Департаменте энергетики США опубликовала последовательность 65 000 пар нуклеотидов, а группа Свантэ Пэбо из Института эволюционной антропологии Макса Планка в Германии сообщила о секвенировании 1 млн пар нуклеотидов [24, 25]. Однако последующий анализ выявил значительное количество ошибок в результатах второй группы – большая доля последовательностей представляла результат контаминации современными



**Рис. 1.** Необычно высокая сохранность ДНК мамонта *M. primigenius*, найденного в 1986 г. в вечной мерзлоте в долине реки Энмынвеем (Западная Чукотка): а – свечение ядер мышечных клеток мамонта *M. primigenius* (возраст около 33 000 лет) при окрашивании флуоресцентным красителем DAPI, свидетельствующее о хорошей сохранности ДНК; б – электрофореграмма тотальной геномной ДНК, выделенной из мышечных клеток мамонта (на дорожку 1 нанесено в 10 раз меньшее количество ДНК, чем на дорожку 2), и контрольной тотальной ДНК из свежеполученных образцов крови человека (дорожки 3 и 4). Правая дорожка – маркер (размер фрагментов указан в т.п.н.) [13]

ДНК. Кроме того, проведенное этой группой «однопроходное» секвенирование не позволяет исключить множество ошибок, возникающих вследствие имеющихся в древней ДНК модификаций нуклеотидов, которые можно будет выявить только при условии многократного секвенирования последовательностей [26–28]. Были выявлены ошибки в первой опубликованной последовательности фрагмента мтДНК неандертальца из пещеры Фельдхофер [29]. Из 27 выявленных различий с мтДНК человека 4 оказались артефактами [30]. Не свободны от ошибок и опубликованные нуклеотидные последовательности других видов – плейстоценового пещерного медведя [31] и мамонта [32, 33] и др.

Аналогичные проблемы (например, необходимость анализа сверхмалых количеств ДНК или ДНК, разрушенной химическими или термическими воздействиями) возникают в ряде случаев и в генетической экспертизе криминалистических образцов. Анализ этих проблем и подходы к их разрешению представлены в данном обзоре.

### ЭКСТРАКЦИЯ ДНК И ПРОБЛЕМА КОНТАМИНАЦИИ

Палеонтологические и археологические материалы и биологические образцы, получаемые при раскопках или хранящиеся в музеях, содержат очень малые количества ДНК, которая обычно сильно фрагментирована. Помимо этого, в древней ДНК присутствуют разного рода модификации, препятствующие амплификации или ведущие к ошибкам чтения нуклеотидной последовательности. Из-за низкой эффективности амплификации аутентичной ДНК, выделенной из древних и исторических образцов, загрязнение

Таблица 1. Критерии аутентичности древней ДНК

Критерии	Значение для аутентичности
Для работы с древней ДНК используют только те реагенты и пластик, которые проверены на возможное присутствие амплифицируемых матриц. Так как матрицы могут содержаться в них в следовых количествах и давать амплификацию лишь в одной из нескольких проб, необходимо проводить множественные проверки.	Предотвращение контаминации через реагенты и расходные материалы.
Параллельно с экстракцией ДНК из образца все манипуляции проводятся с теми же растворами, в которые не внесены матрицы. При ПЦР используется двойной негативный контроль – обычный (реакционная смесь без матрицы) и с добавлением «пустого» экстракта.	Выявление контаминации, которая могла произойти во время экстракции или во время приготовления смеси для ПЦР.
Позитивный контроль обычно не применяется, т.к. он может представлять опасность контаминации.	Предотвращение контаминации.
По возможности осуществляется несколько независимых экстракций ДНК из разных частей образца.	Выявление внутренней контаминации образца.
Повторные амплификации материала, полученного в одной и той же или в разных экстракциях.	Выявление спорадической контаминации и выявление ошибочно включенных нуклеотидов при амплификации деградированной ДНК в экстрактах, содержащих малое число матричных молекул.
Клонирование продуктов амплификации и/или секвенирование множественных клонов.	Выявление гетерогенности в амплифицированных продуктах, возникшей в результате контаминации или при амплификации деградированной ДНК с модифицированными нуклеотидами.
Определение числа амплифицируемых матричных молекул ДНК (должно проводиться для каждой используемой пары праймеров, т.к. число амплифицируемых молекул сильно варьирует в зависимости от длины и нуклеотидного состава амплифицируемого фрагмента и чувствительности специфичных пар праймеров).	Оценка возможности включения нуклеотидов, не соответствующих исходной последовательности. Для экстрактов, содержащих единичные молекулы, вероятность ошибочного включения велика и необходимо проведение нескольких амплификаций. Для экстрактов, содержащих более 1000 молекул, достаточно одной амплификации.
Особое «молекулярное поведение» – обратная корреляция между эффективностью амплификации и длиной амплифицируемого фрагмента.	Если в образце не наблюдается более интенсивная амплификация коротких фрагментов, чем длинных по сравнению с амплификацией современной ДНК, то это является указанием, что источником амплифицированной ДНК явилась контаминация современными матрицами.
Биохимический анализ сохранности макромолекул.	Хорошая биохимическая сохранность макромолекул указывает на высокую вероятность присутствия доступной для анализа ДНК и может поддержать аутентичность результатов секвенирования.
Исключение ядерных вставок мтДНК.	В ядерной ДНК присутствуют гомологи мтДНК, что необходимо учитывать при амплификации мтДНК.
Независимое воспроизведение результатов в другой лаборатории.	Позволяет определить лабораторную контаминацию образцов или реагентов, но не исключает контаминации, присущей самим образцам (загрязнений, присутствовавших в образце до его поступления в лабораторию, например внесенных во время археологических раскопок). Ранее такое требование считалось обязательным, сейчас это ограничение снято.

образца даже единичными молекулами современной ДНК приводит к получению ложных результатов. Вследствие этого, для того чтобы предотвратить амплификацию матриц, не имеющих отношения к исследуемому образцу, необходимо принимать ряд специальных мер, направленных на предотвращение контаминации и выявление результатов возможной контаминации. Ложнопозитивные результаты, обусловленные внутрилабораторной контаминацией, составляют одну из основных проблем исследования древней ДНК. Поэтому ключевым этапом молекулярно-генетического анализа древних и исторических образцов является экстракция ДНК.

Экстракция ДНК из древних образцов должна проводиться с учетом возраста и состояния образца. В частности, от этого зависит выбор детергента, используемого для лизиса клеток. Додецилсульфат натрия (SDS), применяемый в стандартных процедурах выделения ДНК для разрушения липидов, предпочтительно заменять неионными детергентами для мягкого лизиса (Triton или Twin), либо проводить выделение без детергентов, т.к. в палеообразцах липиды уже разрушены, и SDS снижает выход ДНК. Однако при работе с образцами относительно небольшого

возраста применение детергентов оправдано. При обработке костного материала реагентами, содержащими ЭДТА, происходит вымывание кальция из образца и изменение рН раствора, что может повлиять на эффективность связывания ДНК на колонках, применяемых на следующих этапах очистки.

Работа с древней ДНК должна проводиться в специально оборудованных помещениях, в которых принимаются все возможные меры для защиты от контаминации современными ДНК. К ним относятся помещения с измененным давлением воздуха: высоким – там, где идет работа с древними ДНК, и низким – там, где идет работа с современными ДНК или амплифицированными продуктами. Эти помещения должны регулярно дезинфицироваться химическими реагентами и ультрафиолетовым излучением, чтобы избавиться от возможного присутствия в них ДНК (исследуемой, амплифицированной или посторонней) и клеток, ее содержащих (аэрозоли и пыль с микроорганизмами и клетками человека и других организмов). Работа с древней ДНК должна проводиться в защитных костюмах, перчатках и масках. Как минимум, обработка древних образцов и процессы экстракции ДНК, при которых исследователь име-

ет дело с единичными фрагментированными молекулами, должны осуществляться в помещениях, изолированных от тех, в которых проводится ПЦР-амплификация и последующая работа с амплифицированной ДНК, представленной миллионами молекул. В помещениях для работы с древней ДНК не должны проводиться другие работы с амплифицированными фрагментами, т.к. предотвратить их распространение по лаборатории крайне сложно. Работать с ДНК ныне живущих организмов необходимо в отдельном здании или хотя бы в помещении с отдельной вентиляцией. Все эти меры способствуют предотвращению лабораторной контаминации, однако не сказываются на загрязнении образца, возникшем до его поступления в лабораторию. Для снижения вероятности загрязнения поверхностный слой образца обычно удаляется.

Контаминация представляет особенно значимую проблему при исследовании древних образцов человека или микроорганизмов, т.к. и человеческая ДНК, и бактериальная всегда присутствуют в лаборатории, и последовательности примесной ДНК в этих случаях труднее отличить от аутентичных последовательностей, чем при исследовании экзотических или редких видов. Правила работы с древней ДНК и критерии соответствия амплифицированных фрагментов исследуемому образцу древней ДНК (аутентичность) обобщены в ряде обзоров [4, 17, 34–36] и представлены в табл. 1.

### ВЫЯВЛЕНИЕ КОНТАМИНАЦИИ

Возможная контаминация в исследованиях древней ДНК может быть выявлена с большей надежностью, когда при анализе априорно предполагается, что экстракт будет контаминирован, и результаты каждого этапа рассматриваются с точки зрения такой возможной. Для выявления лабораторной контаминации используются т.н. «пустые» экстракции – образцы, которые подвергают таким же процедурам, что и обрабатываемый образец, однако не добавляют материал образца или ДНК. Так как посторонние матрицы могут быть представлены в очень низких концентрациях, проявляясь не в каждой реакции, ставят множественные контроли в отношении 1:5, но не менее чем 1:1 с экстрагируемым образцом. Такие «пустые» экстракты используют далее на всех этапах анализа в дополнение к обычным негативным контролям.

Независимое воспроизведение результатов другой лабораторией считается одним из наиболее сильных аргументов, подтверждающим аутентичность результатов. Однако оно не является абсолютной гарантией [36].

Особое внимание следует уделять биоинформационному анализу полученных нуклеотидных последовательностей. Так как наиболее часто при исследовании древних образцов проводится анализ митохондриальной ДНК (мтДНК), необходимо проводить сравнение полученных последовательностей не только с мтДНК видов, близких к исследуемому, или с мтДНК человека (как возможного источника контаминации), но также и с ядерными гомологами мтДНК (nuclear mtDNAs, numts), уровень сходства которых с мтДНК у человека достигает 98 % (например, для последовательности NT\_004350.18, расположенной на хромосоме 1).

### ХИМИЧЕСКИЕ МОДИФИКАЦИИ ДРЕВНЕЙ ДНК И ПОСТМОРТАЛЬНЫЕ МУТАЦИИ

Постмортальные изменения ДНК и мутации, происходящие при ее амплификации *in vitro*, являются одной из центральных методологических проблем, присущих исследованиям древней ДНК, как и ДНК из образцов, сложных для криминалистической экспертизы. В отличие от метаболически активных тканей, в которых функционируют системы репарации ДНК, в мертвых или спящих клетках накапливаются химические (гидролитические или оксидативные) модификации и разрушения нитей ДНК. Как показывают исследования, постмортальные разрушения ДНК характеризуются разрывами нитей, утратой оснований, а также сшивками между нитями, препятствующими ПЦР. Особенно важными постмортальными изменениями являются химические модификации оснований, не препятствующие амплификации, но приводящие к включению во вновь синтезированную нить нуклеотидов, не соответствующих исходно присутствовавшим в немодифицированной нити ДНК (замены типа I A → G / T → C и замены типа II C → T / G → A) (табл. 2). Характер разрушения деградированных матриц ДНК зависит от возраста образцов, их географической локализации и тафономических условий (условий захоронения останков) той среды, из которых останки были извлечены. Постмортальные изменения могут возникать в «горячих точках» мутирования, имитируя тем самым эволюционный процесс [37]. Характер и динамика накопления постмортальных разрушений в ДНК продолжают исследоваться [38, 39]. Вследствие разрушения ДНК размер большинства фрагментов в древних образцах не превышает 100–500 п.н. Поэтому при проведении ПЦР на древней ДНК подбираются праймеры для амплификации фрагментов не более 200–300 п.н., хотя в отдельных случаях могут быть получены фрагменты и большей длины (рис. 2).

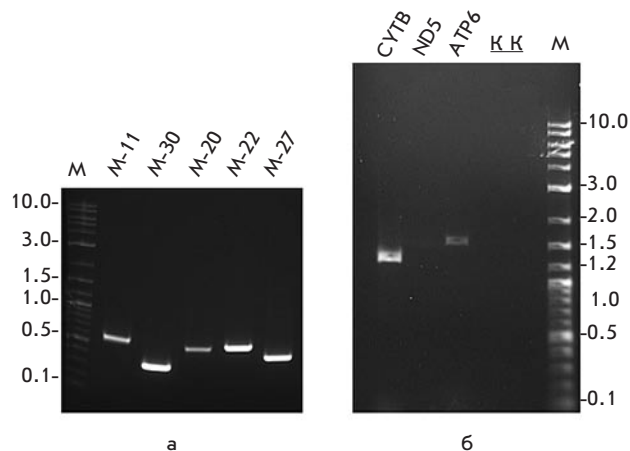


Рис. 2. Пример продуктов ЦПР-амплификации фрагментов митохондриального генома мамонта: а – продукты ЦПР-амплификации коротких фрагментов (300–600 п.н.); б – ЦПР-амплификация длинных фрагментов, содержащих полные митохондриальные гены (1317 п.н. для гена Cytb и 1613 п.н. для гена ATP6), ЦПР-фрагменты большего размера (3054 п.н. для гена ND5) получить не удалось; М – маркер, размер указан в т.п.н.; К – негативные контроли [13]

Таблица 2. Различные типы разрушений в древней ДНК (по [4, 17] с изменениями)

Тип разрушения	Причина разрушения	Влияние на ДНК	Возможное решение
Разрушение азотистых оснований и дезоксирибозы	Постмортальное разрушение внутриклеточными нуклеазами, деградация микроорганизмами и др. химические процессы	Апуринизация ДНК, разрыв нитей, уменьшение размера фрагментов ДНК, снижение общего количества ДНК	Амплификация коротких (100–200 п.н.) перекрывающихся фрагментов
Сшивки, блокирующие ПЦР	Алкилирование, реакция Майяра (реакция конденсации между сахаром и аминогруппой азотистого основания или аминокислоты)	Перекрестные сшивки между нитями ДНК в одной молекуле; перекрестные сшивки между нитями ДНК в разных молекулах или сшивки ДНК с белками	Обработка реагентами, разрушающими сшивки
Дезаминирование и другие формы окислительной или гидролитической модификации оснований	Аденин → гипоксантин Гуанин → ксантин Цитозин → урацил 5-метилцитозин → тимин	Включение при амплификации нуклеотидов, не соответствующих тем, которые присутствовали в данной позиции в исходной немодифицированной матрице	Обработка ДНК урацил-N-гликозилазой, удаляющей продукты дезаминирования цитозина. Определение консенсусной последовательности нуклеотидов на основе многократного секвенирования анализируемых участков: проведение множественных независимых ПЦР, клонирование исходной матрицы или продуктов ПЦР и секвенирование нескольких клонов

Большинство исследований древней ДНК проведено на мтДНК, которая содержится в клетке в количестве сотен и тысяч копий, и с вероятностью большей, чем ядерная ДНК, может быть успешно амплифицирована. Исследований ядерной ДНК намного меньше. Для оценки сохранности ядерной ДНК из образца мамонта *M. Primigenius*, найденного в вечной мерзлоте на Чукотке, были проведены амплификация, клонирование и секвенирование ядерной ДНК (Е.И. Рогаев, Э. Рубин, неопубликованные данные). Большая часть последовательностей генома была представлена фрагментами по 50–100 нуклеотидов (рис. 3). Это свидетельствует об относительно хорошей сохранности ядерной ДНК.

Постмортальные модификации случайным образом распределены в сохранившихся фрагментах ДНК. Так, в исследовании [13] при клонировании ПЦР-амплификатов мтДНК мамонта и последующем секвенировании были обнаружены однонуклеотидные замены в отдельных фрагментах со средней частотой 6 на 1000 нуклеотидов. Это

обстоятельство было учтено для точной реконструкции полной последовательности митохондриального генома чукотского мамонта *M. primigenius* (рис. 4) как консенсуса многократно перекрывающихся фрагментов [13]. Для дополнительного контроля постмортальных мутаций во всех генах мтДНК мамонта были определены общее число замен по сравнению с мтДНК слона *E. maximus* и отношение несинонимичных (ведущих к замене аминокислоты) к синонимичным заменам. При этом число замен в генах мтДНК чукотского мамонта [13] оказалось меньше, чем в генах одновременно опубликованной немецкими коллегами последовательности мтДНК мамонта, найденного в Якутии [40]. Сравнительный анализ показал, что это различие обусловлено необычайно большим количеством замен на участке в 200–300 нуклеотидов в мтДНК якутского мамонта, в области генов *ND1* и *ND2*, при этом число несинонимичных замен превышало число синонимичных – 2:1 для гена *ND1* и 7:2 для гена *ND2*. В гене *ND2* чукотского мамонта была выявлена лишь одна синонимичная замена, а в гене *ND1* отличий от гена слона найдено не было [13]. Недетектированные постмортальные мутации сказываются на результатах филогенетической реконструкции.

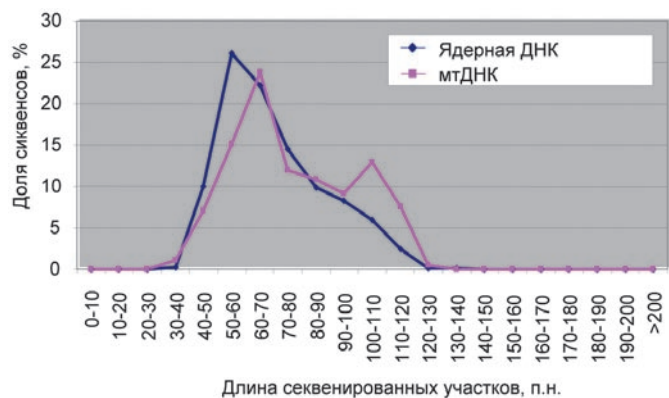
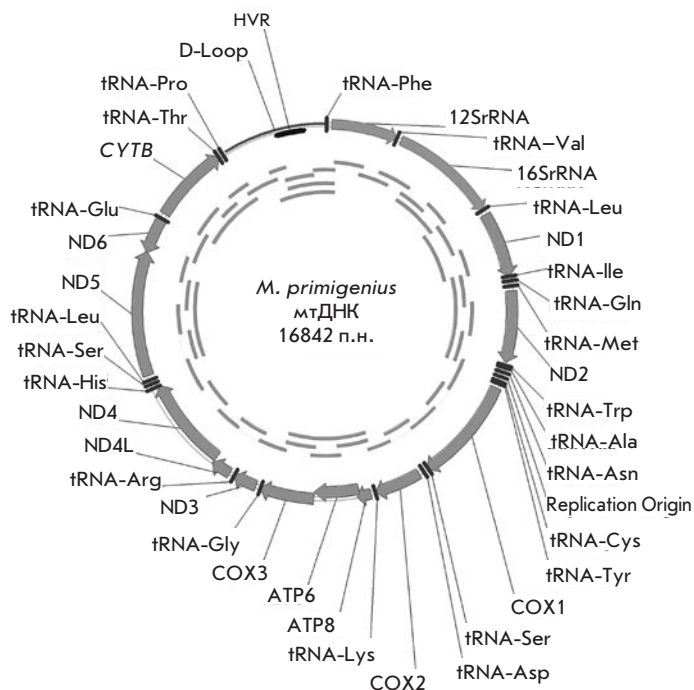


Рис. 3. Распределение размера секвенированных фрагментов при секвенировании на платформе 454. Неопубликованные данные, получены в сотрудничестве Е.И. Рогаева с М. Blow и Е. Rubin

### НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДНК

При исследованиях древней ДНК приходится секвенировать большое количество коротких фрагментов, многократно перекрывающихся одни и те же участки генома. Низкая скорость и высокая стоимость секвенирования ограничивала возможности таких исследований. В последние 3–4 года стали доступны новые технологии массового параллельного секвенирования ДНК, что снизило стоимость секвенирования ДНК на два порядка. Новые технологии позволяют исследователю иметь в своем распоряжении секвенирующие мощности, доступные ранее лишь крупным геномным центрам. Среди новых стратегий секвенирования применение в области исследований древней ДНК нашли технологии клональной амплификации с последующим параллельным секвенированием плотных микропанелей клонированных фрагментов ДНК в повторяющихся циклах



**Рис. 4.** Митохондриальный геном шерстистого мамонта *M. primigenius*. Определение нуклеотидной последовательности полного митохондриального генома было проведено в двух лабораториях. Перекрывающиеся продукты ПЦР-амплификации, использованные для секвенирования, показаны во внутреннем круге [13]

энзиматических реакций с компьютерной регистрацией результирующих сигналов для каждого отдельного фрагмента в каждом цикле.

Упорядоченное расположение в пространстве ПЦР-ампликонов на плоской подложке или их иммобилизация на бусинах микронного размера, которые помещаются в упорядоченные ячейки, позволяет минимизировать объем реакционной смеси, что значительно удешевляет процесс.

Реализация этих стратегий включает несколько этапов, на каждом из которых найдены свои технические решения. Так, при подготовке библиотек фрагментов ДНК с помощью ПЦР количественное соотношение продуктов амплификации не пропорционально количественному соотношению исходных матриц – некоторые фрагменты ДНК амплифицируются более эффективно, тогда как другие малоактивны при амплификации и в результате теряются. Преодолеть эту проблему позволяет эмульсионная ПЦР. Раствор ДНК вводят в смесь минеральных масел с таким расчетом, чтобы каждая молекула оказалась в собственном пузырьке, в котором, как в микрореакторе, проходит ее амплификация. Этот подход позволяет минимизировать потери отдельных исходных матриц. Существуют различные технические решения как для подготовки библиотек фрагментов, так и для других этапов процесса – энзиматических реакций, визуализации и компьютерной регистрации сигнала, хранения и обработки данных [41].

Новые возможности технологий секвенирования сочетаются с определенными ограничениями. Так, массивное параллельное пиросеквенирование, реализуемое платформой 454 Life Science system (Genome Sequence 20tm DNA sequencing System: GS20, Roche/454 Life Science), позволяет в 100 раз быстрее проводить секвенирование, чем стандартный метод с использованием капиллярного электрофореза – за один раз анализируется до 25 млн нуклеотидов. Однако при этом читается последовательность небольшой длины (обычно менее 250–400 п.н.). Собственно, в применении к древней ДНК это не является ограничением, т.к. анализировать приходится множество фрагментов как раз такого размера.

Технология Illumina, ранее называвшаяся Solexa (по названию разработавшей ее компании), и SOLid (компания ABI) позволяют анализировать до 1 млрд нуклеотидов за один проход, но читаются лишь последовательности длиной 30–40 нуклеотидов (год назад было всего 25). Наличие полных последовательностей геномов человека и основных модельных организмов, используемых как референтные последовательности, позволяет картировать короткие прочтенные фрагменты и собирать их в единую последовательность.

Еще одним ограничением применения новых платформ является 10-кратное снижение точности секвенирования по сравнению с методами, основанными на принципе Сэнгера. Однако эти технологии весьма перспективны, и можно ожидать, что они будут усовершенствованы в ближайшем будущем.

#### АНАЛИЗ ДЕГРАДИРОВАННОЙ ДНК В ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЕ ИСТОРИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ

Технологические решения, разработанные при анализе древней ДНК, могут применяться при генетической экспертизе криминалистических образцов в сложных случаях, когда для анализа доступны микроколичества ДНК или она сильно разрушена. Такие подходы были использованы при генетической экспертизе предполагаемых останков семьи императора Николая II Романова. В начале 1990-х годов неподалеку от Екатеринбурга было обнаружено захоронение, содержащее человеческие останки. В ходе расследования было выдвинуто предположение, что останки принадлежат семье российского императора Николая II Романова, его жене императрице Александре Федоровне, их трем дочерям, придворному врачу и трем слугам, которые были расстреляны в 1918 г. [42–44]. Однако останки двух детей семьи Романовых не были идентифицированы, и обстоятельства их судьбы остались неизвестными. Среди прочих версий высказывалось предположение, что Алексей и Анастасия, младшие дети семьи Романовых, выжили в те смутные времена. В июле 2007 г. неподалеку от первого захоронения было найдено второе, с обгоревшими костными фрагментами двух скелетов. Сорок четыре костных фрагмента, извлеченных из второго захоронения, были сильно разрушены огнем и предположительно серной кислотой. Предварительная антропологическая экспертиза полусожженных костных фрагментов из второго захоронения позволила предположить, что они принадлежали мальчику в возрасте 10–14 лет и молодой женщине 18–23 лет. Для проведения генетической экспертизы были

Таблица 3. Подходы, использованные при анализе деградированной ДНК по идентификационным маркерам

Этап анализа	Особые условия	Реагенты и методы
Подготовка исторических образцов	Независимый анализ в специально оборудованных лабораториях ИОГен (Москва) и Медицинской школы университета Массачусетса (Ворчестер, США).	Физическая и химическая очистка поверхности мелких костных фрагментов; измельчение или высверливание для получения костного порошка.
Экстракция ДНК из костных останков	Все экспериментальные процедуры выполнялись в стерильных ПЦР-боксах согласно стандартам, принятым для работы с древней ДНК, с соблюдением всех мер предосторожности во избежание риска загрязнения молекулами современной ДНК.	ДНК экстрагировалась из ~170–700 мг очищенного костного образца с обработкой 0.5 М ЭДТА и протеиназой K и последующей очисткой на колонках QIAquick PCR purification kit, Qiagen в соответствии с протоколом производителя с небольшими модификациями.
Экстракция ДНК из архивных пятен крови	Биологический материал был получен из 4 различных пятен крови. С одного пятна брали как минимум 3 соскоба. Для минимизации возможных загрязнений ДНК выделяли только из вторых и третьих смывов каждого пятна.	Экстракцию ДНК проводили с использованием набора QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) в соответствии с протоколом производителя (DNA Purification from Dried Blood Spots) с некоторыми модификациями.
Количественный анализ ДНК		Количество тотальной ДНК определяли с помощью набора Quant-iT <sup>™</sup> PicoGreen <sup>®</sup> Assay (Invitrogen), специфичной для человека, с использованием набора Plexor <sup>®</sup> HY assay (Promega) и системы 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).
Определение нуклеотидной последовательности ГВР1 и ГВР2 мтДНК исторических образцов	Для контроля возможной контаминацией посторонними ДНК в ходе всех анализов применялись отрицательные контроли (амплификация «пустых» экстрактов и ПЦР без добавления ДНК).	Фрагменты мтДНК амплифицировали в виде коротких перекрывающихся фрагментов. Продукты ПЦР выделялись из агарозного геля с помощью наборов QIAquick Gel Extraction kit или MinElute Gel Extraction kit. Для дополнительной проверки продукты ПЦР образцов из второго погребения были клонированы.
Анализ последовательностей полного митохондриального генома из костных останков	Из-за деградации ДНК амплифицировали короткие перекрывающиеся фрагменты размером 164–383 п.н., покрывающие весь митохондриальный геном.	Из-за малого количества ДНК сначала проводили мультиплексную амплификацию с разработанными 88 парами праймеров, скомпонованных в три набора, затем продукты мультиплексной ПЦР амплифицировали с индивидуальными парами праймеров. Для секвенирования продуктов ПЦР использовали три различных стратегии.
Анализ мтДНК из пятен крови с рубашки Николая II	Для некоторых SNP проводили до 5 или 7 повторяющихся ПЦР.	Поскольку степень сохранности ДНК из пятен крови была неизвестна, был разработан набор ПЦР-праймеров для амплификации коротких (64–109 п.н.) фрагментов ДНК, включающих позиции для очень редких SNP, идентифицированных на предыдущем этапе для образца из скелета № 4 (предполагаемый Николая II).
Экстракция и анализ ДНК из современных образцов	Все процедуры анализа современных ДНК проводились в других зданиях, физически удаленных от лабораторий древней ДНК. От всех ныне живущих родственников, участвующих в исследовании, было получено письменное информированное согласие.	ДНК из щечных соскобов и капель крови экстрагировали по стандартным методикам. ПЦР проводили с использованием набора праймеров для более длинных ПЦР-продуктов.
Сборка фрагментов в непрерывную последовательность нуклеотидов (континги)		Последовательности собирали с помощью программного пакета Seqman software, DNASTAR, с использованием в качестве стандарта исправленной Кембриджской референтной последовательности (rCRS, идентификационный номер AC_000021).
Определение пола		Пол определялся по стандартной методике – амплификация фрагмента гена амелогенина с помощью коммерческих наборов AmpFISTR <sup>®</sup> MiniFiler <sup>™</sup> (Applied Biosystems) и PowerPlex S5 (Promega). Кроме этого использовали специально разработанные праймеры для амплификации коротких фрагментов, специфичных для X- и Y-хромосом.
Анализ ядерных STR-маркеров	При первичном исследовании мтДНК или ядерной ДНК экстракты, содержащие смесь индивидуальных профилей, были исключены из дальнейшего анализа. Для каждого образца из различных экстрактов были выполнены серийные воспроизведения. Гомозиготные локусы считались аутентичными, если при множественных независимых амплификациях наблюдались воспроизведения аллеля для аутосомного STR-маркера.	Для получения профилей аутосомных STR костных образцов из первого и второго погребения использовались наборы AmpFISTR <sup>®</sup> MiniFiler <sup>™</sup> PCR Amplification Kit (Applied Biosystems) и PowerPlex S5 System (Promega), разработанные для анализа деградированной ДНК.
STR-профили Y-хромосомы		Использовали набор AmpFISTR <sup>®</sup> Yfiler <sup>™</sup> (Applied Biosystems) в соответствии с протоколом производителя с минимальными модификациями для деградированной ДНК.
Электрофоретический анализ	Для усиления интенсивности сигнала и снижения «шумов» в STR-профилях в некоторых случаях продукты мультиплексной амплификации очищали по методике, предложенной для генотипирования низкокопийных матриц ДНК с использованием набора Qiagen's MiniElute PCR purification kit.	Электрофоретический анализ проводился с использованием 96-капиллярного секвенатора 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems). Результаты анализировались в пакете программ GeneMapper <sup>®</sup> ID software v3.2 (Applied Biosystems).

Таблица 4. Базы данных, использованные при оценке популяционных частот установленных в исследовании генетических профилей

Объект сравнения	Количество образцов в базе	Использованные базы данных
Полный митохондриальный геном	71664	Mitosearch ( <a href="http://www.mitosearch.org">www.mitosearch.org</a> ) – содержит сиквенсы гипервариабельного района;
	2704	mtDB, Human Mitochondrial Genome Database ( <a href="http://www.genpat.uu.se/mtDB/">www.genpat.uu.se/mtDB/</a> );
	14486	EUROS – собственная база данных, составленная по опубликованным и собственным данным для популяций СССР/России и европейских стран (немцев, англичан и др.)
STR-гаплотип Y-хромосомы	4163	U.S.Consolidated Y-STR Database, где представлены генотипы для 15–17 STR локусов ( <a href="http://www.usystrdatabase.org/">http://www.usystrdatabase.org/</a> )
	1261	Данные для русских из Y Chromosome Haplotype Reference Database (YHRD, <a href="http://www.yhrd.org/index.html">www.yhrd.org/index.html</a> )
Аутосомные STR	> 50 000	Для целей данного исследования объединили неперекрывающиеся данные для европейских популяций из двух больших баз данных: ALFRED ( <a href="http://alfred.med.yale.edu/alfred/">http://alfred.med.yale.edu/alfred/</a> ) и The Distribution of the Human DNA-PCR Polymorphisms database ( <a href="http://www.uniduesseldorf.de/WWW/MedFak/Serology/database.html">http://www.uniduesseldorf.de/WWW/MedFak/Serology/database.html</a> ) и добавили недавно опубликованные данные по русским популяциям
SNP в позиции IVS3-3 гена F9		Популяционные базы данных SNP (NCBI, MapMap Project);
		~ 928 X-хромосом здоровых индивидов европейского происхождения, генотипы которых по анализируемому SNP были установлены с помощью ПЦР-ПДРФ для данного исследования  База данных мутаций гемофилии В (Hemobase: Hemophilia B mutation registry; Haemophilia B mutation database)

отобраны наименее разрушенные фрагменты бедренных костей мужского и женского скелетов, которым были присвоены номера 146 и 147. Для проведения повторного более детального исследования были получены фрагменты останков из первого захоронения и собраны биологические образцы от ныне живущих родственников Николая Романова и Александры Федоровны. Помимо этого для анализа были использованы смывы с пятен крови на рубашке Николая II, хранившейся в Эрмитаже. Исследование включало следующие этапы: подготовка образцов для выделения ДНК; экстракция ДНК; определение количества выделенной тотальной ДНК и человеческой ДНК; амплификация и секвенирование гипервариабельных участков, а затем полной последовательности мтДНК (пмтДНК); определение STR-профилей Y-хромосомы; определение аутосомных STR-профилей; дополнительная идентификация пола с использованием маркера, разработанного для анализа деградированной ДНК [45, 46]; выделение и анализ современных ДНК и сравнение их с историческими образцами. Более подробно этапы и методы исследования ДНК-идентификационных маркеров описаны в табл. 3 [45].

**АНАЛИЗ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА**

Полные нуклеотидные последовательности митохондриального генома были определены для предполагаемых останков Николая II и Александры Федоровны из первого захоронения и предполагаемых останков Алексея и его сестры из второго захоронения. Установленные митотипы предполагаемых Николая II и Александры Федоровны относятся к распространенным в Европе гаплогруппам мтДНК T2 и H1.

Последовательности пмтДНК были определены также для потомков Королевы Виктории (1819–1901) по женской линии в двух ветвях – потомков принцессы Виктории, сестры Александры Федоровны, и ее родной тети принцессы Беатрис (рис. 5). Их пмтДНК полностью совпали с установленными для предполагаемых останков Александры Федо-

ровны и детей из второго захоронения. Поиск в доступных базах данных для пмтДНК (табл. 4) показал, что ни одна из представленных в них десятков тысяч последовательностей не совпадает с пмтДНК, названной “Queen Victoria mitotype”. Таким образом, в первом и втором захоронении действительно обнаружены останки внучки, правнучки и правнука Королевы Виктории.

При определении пмтДНК из предполагаемых останков Николая II было подтверждено описанное ранее наличие гетероплазмии (присутствия разных вариантов мтДНК) по сайту 16169С/Т. Помимо этого были выявлены нуклеотидные замены в кодирующей части мтДНК, в т.ч. очень редкий вариант 2850С в гене 16S rRNA (популяционная частота около 0.004). Нуклеотидные замены в мтДНК из предполагаемых останков Николая II и из пятен крови на рубашке полностью совпали [45]. Соотношение гетеро-

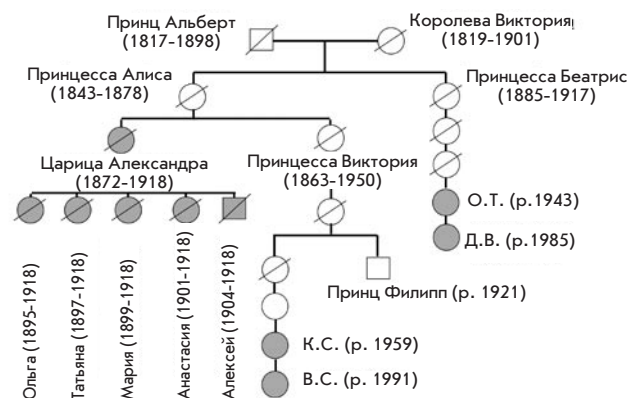


Рис. 5. Материнские линии царицы Александры Федоровны. Затемненными символами отмечены члены семьи, чей генетический материал был исследован

плазмичных вариантов мтДНК было сходным в костных останках и крови. У брата Николая II Георгия, останки которого были исследованы ранее, была выявлена гетероплазмия по той же позиции [43]. У потомков сестры Николая II Ксении был гомоплазмичный вариант 16169 Т, а в проведенном ранее исследовании мтДНК сына сестры Николая II Ольги был выявлен гомоплазмичный вариант 16169С [44]. Ни один из этих вариантов мтДНК не совпадал с последовательностями в базах данных (табл. 4), что свидетельствует в пользу предположения, что исследованные останки принадлежат Николаю II.

Из приведенных данных следует, что Николай II и Георгий Романовы унаследовали гетероплазмю от своей матери Марии Федоровны (принцессы Дагмар) и что у ее потомков за два поколения произошла сегрегация разных вариантов мтДНК. Нуклеотидная замена в позиции 16169, обуславливающая гетероплазмю в линии Дагмар, возникла в некодирующем (гипервариабельном) районе мтДНК, отличающемся более высоким уровнем полиморфизма, чем кодирующие участки. Популяционная частота гетероплазии по точечным заменам в гипервариабельном районе, согласно данным недавнего мультипопуляционного исследования, составляет в среднем 6 % [47]. Предполагается, что быстрая сегрегация гетероплазмичных вариантов мтДНК у потомков происходит из-за прохождения «бутылочного горлышка» (значительного снижения числа копий мтДНК) в процессе созревания ооцита на стадии постнатального фолликулогенеза у млекопитающих [48].

**АНАЛИЗ ЯДЕРНЫХ STR-МАРКЕРОВ**

Для исследования родства по мужской линии предполагаемых останков Николая II и Алексея были определены

STR-гаплотипы Y-хромосомы. Из-за малых количеств и фрагментированности доступной для анализа ДНК были разработаны процедуры, повышающие чувствительность метода (часть из них перечислена в табл. 3) [45]. STR-аллели были определены во множественных независимых воспроизведениях ПЦР с использованием не менее трех различных экстракций ДНК. Аутентичными считались только аллели, проявившиеся минимум в двух повторных анализах. При этих условиях был получен полный профиль для костных образцов скелета № 4 и архивных образцов крови Николая II. Для низкокопийной высокодеградированной ДНК часты выпадающие аллели для STR-маркеров. Маркер DYS385 выявляет два локуса на Y-хромосоме. Аллель с высоким молекулярным весом (DYS385/ 14) наблюдался только один раз в повторяющихся экспериментах с ДНК, экстрагированной из образца № 146, поэтому данный аллель для образца № 146 формально обозначен как неопределенный (ND). В качестве объектов сравнения использовали ДНК из архивных пятен крови на рубашке Николая II и ДНК его родственников по мужской линии (рис. 6). STR-гаплотипы Y-хромосом исследуемых образцов и объектов сравнения полностью совпали (рис. 7 и табл. 5).

Этот 17-локусный гаплотип уникален. Он не встречается в обширных популяционных базах данных для мультилокусных Y-STR (табл. 4) и впервые обнаружен в описываемом исследовании [45].

Дальнейшее генотипирование половых хромосом и аутосомом с использованием систем мультиплексного STR-анализа, разработанных для деградированной ДНК, показало, что мужчина (образец № 146) и женщина (образец № 147) из второго захоронения имеют генотипы,

Рис. 6. Гетероплазмия 16169С/Т в митохондриальных (материнских) линиях императора Николая II

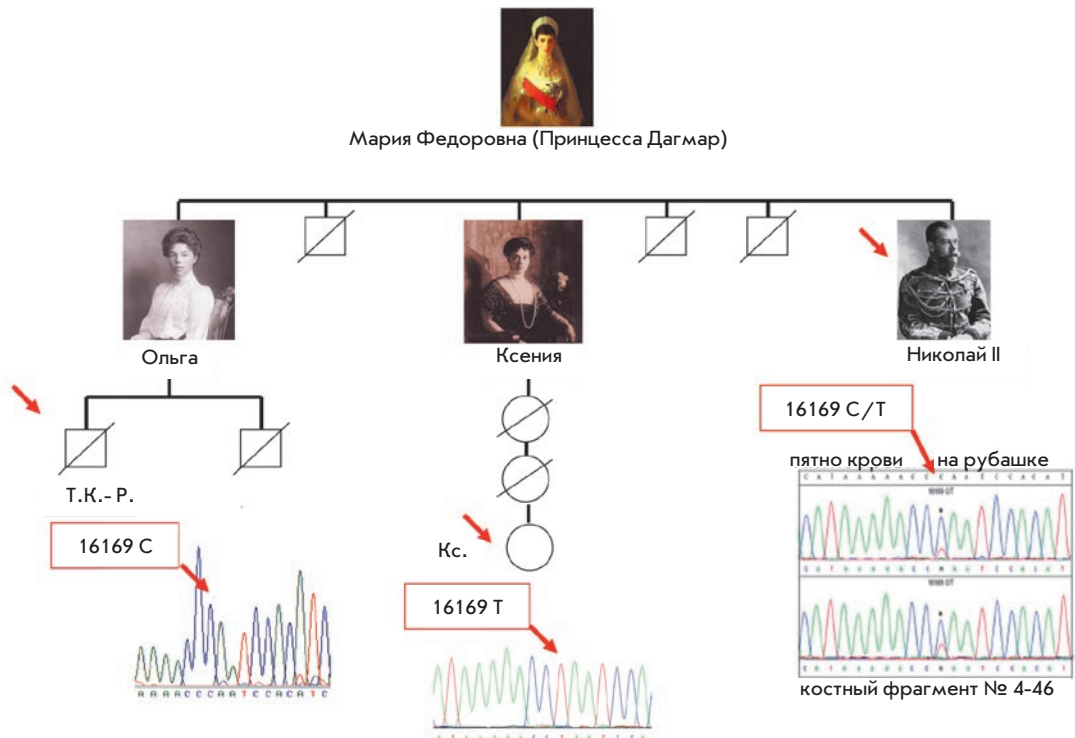




Таблица 5. Анализ STR-гаплотипов Y-хромосомы

Маркеры	№ 4	№ 146	Члены семьи Романовых	Архивное пятно крови на рубашке	Контрольная ДНК ABI, 007
DYS456	16	16	16	16	15
DYS389I	13	13	13	13	13
DYS390	24	24	24	24	24
DYS389II	29	29	29	29	29
DYS458	17	17	17	17	17
DYS19	14	14	14	14	15
DYS385	11, 14	11, ND	11, 14	11, 14	11, 14
DYS393	13	13	13	13	13
DYS391	10	10	10	10	11
DYS439	11	11	11	11	12
DYS635	24	24	24	24	24
DYS392	13	13	13	13	13
Y-GATA-H4	12	12	12	12	13
DYS437	15	15	15	15	15
DYS438	12	12	12	12	12
DYS448	19	19	19	19	19

не совпадающие ни с одним из генотипов, определенных для останков членов семьи Романовых из первого захоронения, но соответствующие их биологическим родственникам (рис. 8). Эти данные ясно указывают на то, что вновь найденные костные останки могут принадлежать царевичу Алексею и одной из дочерей императорской семьи. Представленные данные анализа ядерной ДНК, поддержанные антропологическими данными, доказывают, что останки из второго захоронения принадлежат молодой женщине (№ 147) и мальчику (№ 146); образцы из второго захоронения не принадлежат скелету № 7 (предполагаемая мать, императрица Александра Федоровна) или скелету № 4 (предполагаемый отец, император Николай II); однако они связаны с ними через материнскую и отцовскую линии.

Статистическая оценка (отношение правдоподобия) по трем использованным идентификационным системам того, что костные останки принадлежат Николаю II, а не какому-либо другому случайному индивиду, составляет порядка септильона ( $> 10^{26}$ ) [45]. Полученная совокупность результатов генотипирования доказывает без всяких сомнений, что исследованные останки принадлежат последнему российскому императору Николаю II Романову, его жене императрице Александре Федоровне, их четырем дочерям (великим княжнам Ольге, Татьяне, Марии и Анастасии) и сыну (царевичу Алексею).

**ГЕМОФИЛИЯ: ПОИСК МУТАЦИЙ В ГЕНАХ ФАКТОРОВ СВЕРТЫВАЕМОСТИ КРОВИ**

Известно, что царевич Алексей страдал кровотечениями, характерными для гемофилии. В настоящее время известно, что гемофилия возникает из-за недостаточной активности факторов свертываемости крови. Дефицит фактора VIII, возникающий из-за мутаций в гене F8, вызывает более распространенную гемофилию А (примерно один из 5000 мальчиков рождается с этой болезнью), а дефицит

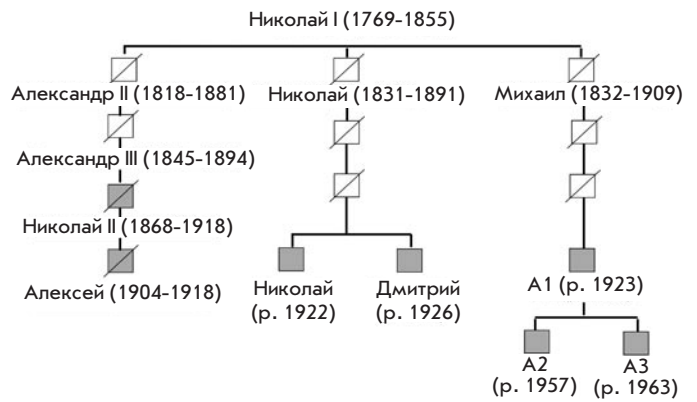


Рис. 7. Отцовские линии в семье Романовых. Затемненными символами отмечены члены семьи, чей генетический материал был исследован

фактора IX – гемофилию В (ген F9), встречающуюся в 5 раз реже.

В настоящее время описано несколько сотен различных мутаций, вызывающих гемофилию. Оба гена локализованы на X-хромосоме, поэтому при наличии мутантного гена у мужчин заболевание проявляется, тогда как женщины, имеющие одну копию мутантного гена и одну копию нормального, в большинстве случаев практически здоровы, хотя у небольшой части (10 %) может быть снижена свертываемость крови. О носительстве мутации у женщины можно судить по наличию у ее сыновей гемофилии.

Это наследственное заболевание встречалось в королевских семьях Европы – у сыновей, внуков и правнуков королевы Виктории (рис. 9, в). Сама королева заболеванием не страдала, но, видимо, являлась носителем мутантного гена. Среди ныне живущих ее потомков гемофилия не зафиксирована.

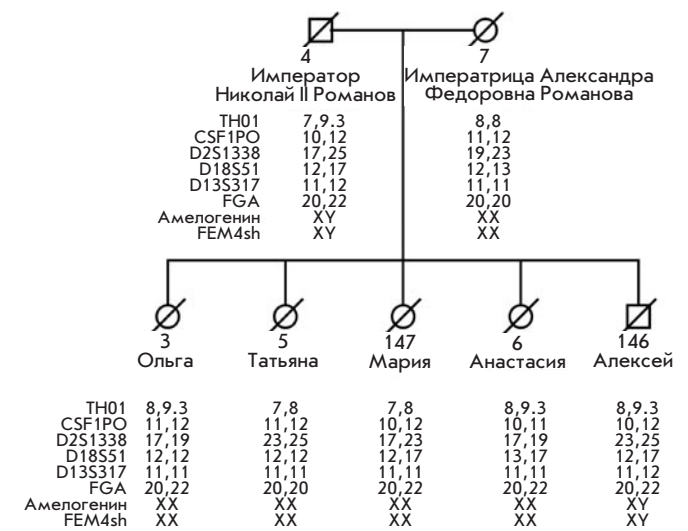


Рис. 8. Анализ половых и аутосомных STR-маркеров в ДНК из костных останков [45]

Таблица 6. Подходы, использованные при скрининге мутаций в генах *F8* и *F9*

Этап анализа	Особые условия	Реагенты и методы
Мультиплексная ПЦР-амплификация генов фактора VIII, <i>F8</i> (26 экзонов) и фактора IX, <i>F9</i> (8 экзонов), локализованных на X-хромосоме	Для анализа ядерных генов были выбраны экстракты, показавшие отсутствие контаминации посторонними образцами по результатам анализа мтДНК и STR-маркеров. Так же как и на предыдущих этапах, использовались негативные контроли: ПЦР-амплификация «пустых» экстрактов (полученных в результате проведения всех процедур экстракции, но без добавления костного образца) и ПЦР-амплификация без добавления ДНК.	Для мультиплексной ПЦР было разработано ~ 210 пар праймеров для амплификации коротких перекрывающихся фрагментов (< 200 п.н.), покрывающих все экзоны и интрон-экзонные границы в генах <i>F8</i> и <i>F9</i> . Праймеры были сконструированы в 14 наборов для гена <i>F8</i> и 3 набора для гена <i>F9</i> , каждый набор включал от 7 до 30 пар праймеров. Для первичной мультиплексной ПЦР использовали ~ 100 пикограмм человеческой ДНК (соответствует 16–17 диплоидных геномов).
Секвенирование	Параллельно осуществлялось секвенирование генов факторов свертывания крови <i>F8</i> и <i>F9</i> и митохондриального генома для контроля контаминации и однозначной идентификации образца.	Индивидуальные ПЦР-фрагменты очищали из 2.5 % агарозного геля и секвенировали с использованием двух стратегий. При одном подходе продукты ПЦР смешивали примерно в эквимольных количествах и использовали для секвенирования (Illumina GA). Другой подход представлял прямое секвенирование индивидуальных ПЦР-продуктов на 96-капиллярном секвенаторе 3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems).
Генотипирование выявленной мутации в гене <i>F9</i>	Всего было выполнено 8 независимых амплификаций ДНК из образца № 7 (императрица Александра). Для остальных костных образцов анализа подвергали от 2 до 7 независимых экстрактов из каждого образца.	Мутация, исходно выявленная при анализе ДНК из скелета № 7, была верифицирована секвенированием ультракоротких ампликонов (63 п.н. и 83 п.н.), полученных со специально разработанными праймерами. Те же праймеры были использованы для амплификации ДНК из костных фрагментов № 146 (царевич Алексей) и № 3, № 5, № 6, № 147 (дочери Николая II и Александры).
Анализ продуктов сплайсинга		Амплифицированный фрагмент, содержащий участок с мутацией в гене <i>F9</i> , был клонирован в векторе pET01 Exontrap (MoBiTec). После подтверждения структуры рекомбинантной молекулы секвенированием ее использовали для трансфекции культуры клеток. На сплайсированной РНК получали кДНК с помощью RT-PCR. кДНК амплифицировали, и библиотеку ПЦР-продуктов секвенировали (Illumina GA). Всего идентифицировали сплайсированные последовательности в 812,114 прочтениях. Из них 99.982 % транскриптов были сгенерированы сплайсингом в мутантном сайте, и только 0.018 % сплайсировались по сайту дикого типа.

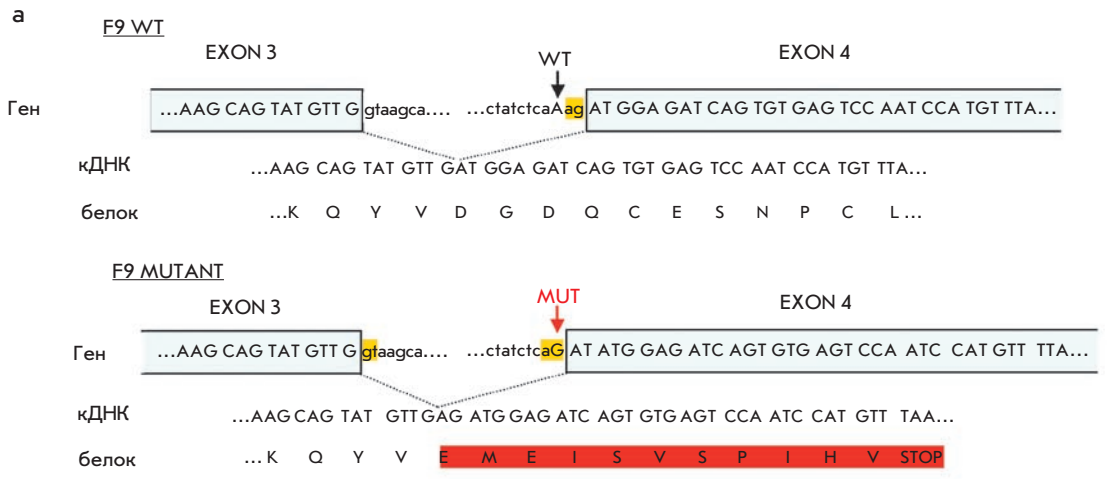
Для того чтобы определить, имелись ли мутации в генах *F8* или *F9* Александры Федоровны и царевича Алексея, была проведена мультиплексная ПЦР-амплификация всех экзонов и интрон-экзонных границ в этих генах с последующим массивным параллельным секвенированием полученных продуктов. Малые количества ДНК и высокая степень ее деградации потребовали применения специальных подходов для определения нуклеотидных последовательностей фрагментов, содержащих 26 экзонов гена *F8* и 8 экзонов гена *F9* (описание стратегии и методов исследования дано в табл. 6).

Исследование было начато с экстрактов ДНК Александры, которые по результатам анализа мтДНК и аутосомных STR-маркеров на предшествующем этапе показали отсутствие контаминации. Одновременно с амплификацией генов *F8* и 8 экзонов гена *F9* проводилась амплификация мтДНК для контроля контаминации и однозначной идентификации образца. Несинонимические замены или инсерционно-делеционные мутации не были найдены ни в гене *F8*, ни в гене *F9*. Однако на интрон-экзонной границе, за 3 нуклеотида до начала экзона 4 в гене *F9*, была выявлена однонуклеотидная замена А =>G, названная, согласно номенклатуре, IVS3-3A>G. Как и следовало ожидать для гетерозиготного носителя, у Александры Федоровны присутствовало и мутантные последовательности, и аллели дикого типа. В образцах останков Алексея содержался только мутантный аллель, что указывает, что он был гемизиготой по мутации, тогда как одна из его сестер (пред-

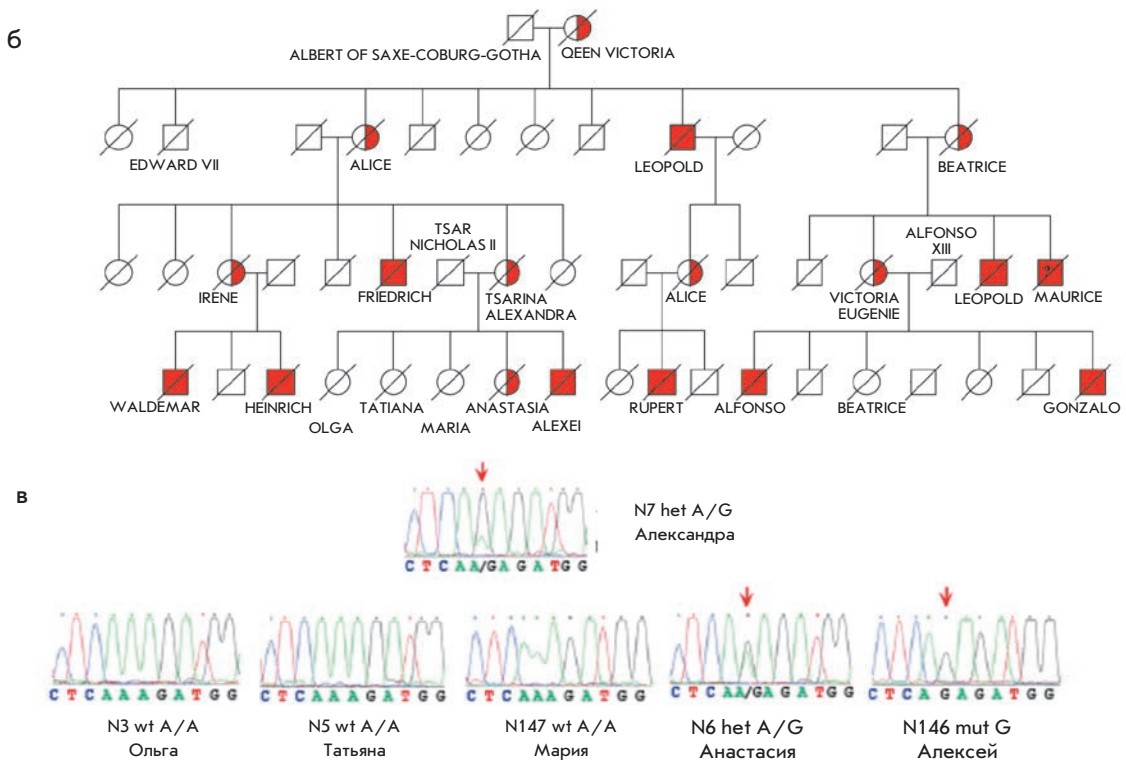
положительно Анастасия) была гетерозиготным носителем мутации. У других сестер мутация выявлена не была, они были гомозиготными носителями аллелей дикого типа (рис. 9) [49].

Биоинформационный анализ показал, что мутация IVS3-3A>G активирует критический акцепторный сайт сплайсинга, что ведет к сдвигу открытой рамки считывания в мРНК гена *F9* и появлению преждевременного стоп-кодона (рис. 9, а).

Влияние выявленной мутации на сплайсинг РНК было оценено экспериментально при экспрессии содержащего мутантный нуклеотид фрагмента гена *F9* в культуре клеток в составе специального рекомбинантного вектора Exontrap (MoBiTec). Оценка показала, что 99.98 % транскриптов образовывались в результате сплайсинга по мутантному сайту. При сохранении менее 1 % активности факторов VIII или IX гемофилия проявляется в тяжелой форме [50]. При поиске в популяционных базах данных и генотипировании большой выборки индивидов мутация IVS3-3A>G не была обнаружена, но при поиске в регистре мутаций гемофилии В были найдены три индивида с такой же мутацией (табл. 4 и 5). У всех троих была снижена активность фактора IX (не более 1 % нормальной активности) и наблюдалась тяжелая форма гемофилии В. Полученные данные показывают, что наследственное заболевание в роду королевы Виктории, в т.ч. у царевича Алексея, представляло тяжелую форму гемофилии В, вызванной редкой мутацией в гене *F9* [49]. Так как у предков королевы Викто-



**Рис. 9.** Гемофилия в королевских домах Европы: а – точечная мутация в гене фактора свертывания крови F9, создающая альтернативный сайт сплайсинга [49]; б – родословная, показывающая передачу гемофилии от королевы Виктории к ее потомкам; в – секвенационные хроматограммы фрагмента последовательности гена F9, полученные при анализе ДНК из костных останков



рии случаи гемофилии не известны, можно предположить, что эта мутация могла возникнуть *de novo* при образовании гамет у одного из ее родителей.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Методы анализа ДНК, разработанные и ставшие доступными в последние годы, позволяют экспериментально определять, а затем реконструировать последовательности нуклеотидов ДНК из биологических образцов длительного хранения в природных условиях или относительно недолго хранившихся в условиях, нарушаю-

щих целостность молекулы ДНК и структуру молекул, ее составляющих. Возможность получения результатов на таких образцах определяется применением новых технологий секвенирования и новых модификаций методов выделения и очистки ДНК, проведением работ в особо подготовленных и оборудованных помещениях и условиях, значительно большим количеством и разнообразием контрольных экспериментов, дополнительными способами анализа данных, исключаящими ошибки интерпретации полученных результатов. Все это позволило получать информацию об организмах, вымерших десятки тысяч лет

тому назад, реконструировать эволюционные события, ранее недоступные экспериментальному исследованию. Эти разработки открыли новые возможности предельно тонкого молекулярно-генетического анализа даже на сильно разрушенной и поврежденной ДНК, что вывело на новый уровень выполнение практически важных работ по судебно-медицинской экспертизе. Приведенные в обзоре результаты не могли быть получены без разработки новых методов и технологий анализа ДНК, которые теперь могут быть перенесены в практику каждодневных

фундаментальных и прикладных исследований, делая их более надежными, быстрыми, дешевыми и информативными. ●

*Работа поддержана ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы» (ГК 02.512.11.2231) и Подпрограммой «Генофонды и генетическое разнообразие» Программы Президиума РАН «Биологическое разнообразие».*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Higuchi R., Bowman B., Freiberger M., Ryder O.A., Wilson A.C. // Nature. 1984. 312 (5991). P. 282–284.
- Higuchi R.G., Wrischnik L.A., Oakes E. et al. // J. Mol. Evol. 1987. 25 (4). P. 283–287.
- Pääbo S. // Nature. 1985. 314. P. 644–645.
- Willerslev E., Cooper A. Ancient DNA. // Proc. Biol. Sci. 2005. 272 (1558). P. 3–16.
- Poinar H.N., Höss M., Bada J.L., Pääbo S. // Science. 1996. 272 (5263). P. 864–866.
- Smith C.I., Chamberlain A.T., Riley M.S. et al. // Nature. 2001. 410 (6830). P. 771–772.
- Gilbert M.T., Wilson A.S., Bunce M. et al. // Curr. Biol. 2004. 14. P. R463–R464.
- Shapiro B., Drummond A.J., Rambaut A. et al. // Science. 2004. 306 (5701). P. 1561–1565.
- Willerslev E., Hansen A.J., Brand T.B. et al. // Science. 2003. 300 (5620). P. 792–795.
- Willerslev E., Hansen A.J., Brand T.B. et al. // Curr. Biol. 2004. 14 (1). P. R9–R10.
- Barnes I., Mathews P., Shapiro B., Jensen D., Cooper A. // Science. 2002. 295. P. 2267–2270.
- Lambert D.M., Ritchie P.A., Millar C.D. et al. // Science. 2001. 295 (5563). P. 2270–2273.
- Rogaev E.I., Moliaka Y.K., Malyarchuk B.A. et al. // PLoS Biol. 2006. 4 (3). P. e73.
- Saiki R.K., Scharf S., Faloona F. et al. // Science. 1985. 230 (4732). P. 1350–1354.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S. et al. // Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1986. 51 Pt 1. P.263–373.
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S. et al. // Science. 1988. 239 (4839). P. 487–491.
- Pääbo S., Poinar H., Serre D. et al. // Annu. Rev. Genet. 2004. 38. P. 645–679.
- Ho S.Y., Gilbert M.T. Ancient mitogenomics. // Mitochondrion. 2010. 10 (1). P. 1–11.
- Ramakrishnan U., Hadly E.A. // Mol Ecol. 2009. 18 (7). P. 1310–1330.
- Hofreiter M., Stewart J. // Curr Biol. 2009. 19 (14). P. R584–R594.
- Woodward S.R., Weyand N.J., Bunell M. // Science. 1994. 266 (5188). P. 1229–1232.
- Collura R.V., Stewart C.B. // Nature. 1995. 378 (6556). P. 485–489.
- Cooper A., Wayne R. // Current Opinion in Biotechnology. 1998. 9. P. 49–53.
- Noonan J.P., Coop G., Kudavalli S. et al. // Science. 2006. 314 (5802). P. 1113–1118.
- Green R.E., Krause J., Ptak S.E. et al. // Nature. 2006. 444 (7117). P. 330–336.
- Wall J.D., Kim S.K. // PLoS Genet. 2007. 3 (10). P. 1862–1866.
- Green R.E., Malaspina A.S., Krause J. et al. // Cell. 2008. 134 (3). P. 416–426.
- Pennisi E. // Science. 2009. 323 (5916). P. 866–871.
- Krings M., Stone A., Schmitz R.W. et al. // Cell. 1997. 90. P. 19–30.
- Schmitz R.W., Serre D., Bonani G. Et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. 99 (20). P. 13342–13347.
- Noonan J.P., Hofreiter M., Smith D. et al. // Science. 2005. 309 (5734). P. 597–599.
- Poinar H.N., Schwarz C., Qi J. et al. // Science. 2006. 311 (5759). P.392–394.
- Schwarz C., Debruyne R., Kuch M. et al. // Nucleic Acids Res. 2009. 37 (10). P. 3215–3129.
- Cooper A., Poinar H.N. // Science. 2000. 289 (5482). P. 1139.
- Binladen J., Wiuf C., Gilbert M.T. et al. Assessing the fidelity of ancient DNA sequences amplified from nuclear genes. // Genetics. 2006. 172 (2). P. 733–741.
- Endicott P., Sanchez J.J., Pichler I. et al. // BMC Genet. 2009. 10. P. 29.
- Pusch C.M., Broghammer M., Nicholson G.J. et al. //Mol. Biol. Evol. 2004. 21 (11). P. 2005–2011.
- Gilbert M.T., Hansen A.J., Willerslev E. et al. // Am J. Hum. Genet. 2003. 72 (1). P. 48–61.
- Lamers R., Hayter S., Matheson C.D. // J. Mol. Evol. 2009. 68 (1). P. 40–55.
- Krause J., Dear P.H., Pollack J.L. // Nature. 2006.439 (7077). P. 724–727.
- Shendure J., Ji H. // Nat. Biotechnol. 2008.;6 (10). P. 1135–1145.
- Gill P., Ivanov P.L., Kimpton C. et al. // Nat. Genet. 1994. 6 (2). P. 130–135.
- Ivanov P.L., Wadhams M.J., Roby R.K. et al. // Nat. Genet. 1996. 12 (4). P. 417–420.
- Rogaev E.I. Анализ митохондриальной ДНК предполагаемых останков Николая II и его племянника. // В кн.: Покаяние. Материалы правительственной комиссии: М., 1998. С. 171–182.
- Rogaev E.I., Grigorenko A.P., Moliaka Y.K. et al // Proc. Natl. Acad. Sci U S A. 2009a. 106 (13). P. 5258–5263.
- Григоренко А.П., Андреева Т.В., Рogaев Е.И. // Медицинская генетика. 2009. 8 (4). С. 45–46.
- Irwin J.A., Saunier J.L., Niederstatter H. et al. // J. Mol. Evol. 2009.68. P. 516–527.
- Wai T., Teoli D., Shoubridge E.A. // Nat. Genet. 2008. 40 (12). P. 1484–1488.
- Rogaev E.I., Grigorenko A.P., Faskhutdinova G., Kittler E.L., Moliaka Y.K. // Science. 2009b. 326 (5954). P. 817.
- White G.C., Rosendaal F., Aledort L.M. et al. // Thromb. Haemost. 2001. 85 (3). P. 560.

УДК 575:599.9

# Геномика на пути к предиктивной медицине

В.С. Баранов

НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта СЗО РАМН, 199034, Санкт-Петербург,

Менделеевская линия, 3

E-mail: baranov@vb2475.spb.edu

**РЕФЕРАТ** Рассмотрены основные достижения геномики в диагностике и профилактике болезней человека. Для моногенных болезней эти проблемы в значительной степени уже решены. Основное внимание геномики сегодня направлено на выяснение роли наследственных факторов в этиологии частых мультифакторных заболеваний (МФЗ). Патогенетическую основу МФЗ составляет представление о функциональных генетических модулях – ФГМ. Идентификация генов ФГМ, ассоциированных с МФЗ, позволяет подойти к выявлению лиц с наследственной предрасположенностью к болезни и начать ее профилактику, что и составляет основную задачу предиктивной медицины. Рассматривается концепция «генетического паспорта», ее современное состояние, сложности практического внедрения, связанные с достоверностью результатов генетического тестирования (ГТ), выявлением генов-кандидатов ФГМ и адекватной интерпретацией полученных результатов. Успешному решению этих проблем способствуют новые методы ДНК-анализа (GWAS genome wide association studies – полногеномный скрининг ассоциаций, высокоэффективные методы ДНК-секвенирования). Главная задача современной геномики – оценить значение результатов ГТ для клиники, определить условия их внедрения в практическую медицину. Возможные пути решения данной проблемы в РФ включают: сопоставление имеющихся результатов ГТ МФЗ отечественных популяций с мировыми данными их полногеномного скрининга (1); создание репрезентативных (не менее 1000 образцов) ДНК-банков – на каждое МФЗ (2); тестирование на отечественных коллекциях ДНК новых генов-кандидатов (3); создание центров по внедрению полногеномного скрининга GWAS (4).

**Ключевые слова:** геномика, генетическое тестирование, мультифакторные болезни, генетический паспорт, общегеномный скрининг ассоциаций.

**Список сокращений:** ГП – генетический полиморфизм, ФГМ – функциональный генетический модуль; ГТ – генетическое тестирование, генетические тесты; МФЗ – мультифакторные заболевания; GWAS – genome wide association studies – полногеномный скрининг ассоциаций; SNP – single nucleotide polymorphism – однонуклеотидные полиморфизм – снп; ПС – полиморфные сайты; STR – short tandem Repeats – короткие tandemные повторы; HarMap – гаплоидный геном; VNTR – Variable Number Tandem Repeats – варьирующее число tandemных повторов; CNV – copy number variation – варьирование числа копий

## ВВЕДЕНИЕ

Револьюционные достижения генетики человека, связанные с расшифровкой его генома, успешным завершением программы HarMap (гаплоидный геном), бурным развитием биоинформатики и нанотехнологии, успехи в создании высокоэффективных методов анализа генома, знаменуют начало новой эры – эры геномики, а наступивший XXI век позволяют назвать веком генетики [1, 2]. Впечатляющие итоги сравнительной и функциональной геномики способствовали ее широкому внедрению в медицину, привели к появлению и быстрому развитию медицинской геномики, в которой проблемы классической медицины: диагностика, профилактика и лечение решаются на уровне нуклеиновых кислот и продуктов их экспрессии – РНК и белков [3, 4, 5]. Профилактическим направлением молекулярной медицины стала предиктивная (предсказательная) медицина (ПМ), основные особенности которой – индивидуальный характер (геном каждого человека индивидуален) и профилактическая направленность (анализ генома возможен на любой стадии онтогенеза, задолго до начала заболевания). Основные положения предиктивной медицины и генетического тестирования (ГТ) как методической основы ПМ, а также концепция «генетического паспорта» были сформулированы нами еще в 2000 г. [5, 6, 37].

## 1. ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ КАК ОСНОВА ПМ

Геномы всех людей, за исключением однойцовых близнецов, различны. Выраженные популяционные, этнические и, главное, индивидуальные особенности геномов как в их транскрибируемой части (экзоны), так и в их некодирующих последовательностях (межгенные промежутки, интроны), обусловлены мутациями, приводящими к генетическому полиморфизму (ГП). Последний обычно определяют как менделевский признак, встречающийся в популяции, по крайней мере, в двух вариантах с частотой не менее 1 % для каждого [10]. ГП может быть количественным либо качественным.

Количественный ГП представлен факультативными элементами, на долю которых приходится до 50 % всего генома. Это микро- и минисателлитная ДНК, а также образующая tandemные повторы (STR – Short Tandem Repeats), ретротранспозоны, повторы большей протяженности с варибельной по нуклеотидному составу коровой последовательностью – VNTR (Variable Number Tandem Repeats). Наконец, в последние годы, благодаря новым методам ДНК-анализа (сравнительные геномные вариации – CNV – Copy Number Variation) и полногеномному скринингу ассоциаций – GWAS – Genome Wide Association Studies), в геноме человека показано наличие полиморфиз-

ма по большим фрагментам ДНК (1–50 МгБ), т.н. варьирующее число копий (Copy Number Variation – CNV).

Качественный ГП представлен преимущественно однонуклеотидными заменами (ОНЗ) – single nucleotide polymorphism (SNP). Это самый частый ГП – встречается примерно через каждые 300–400 п.о. Соответственно, общее число SNP во всем геноме человека оценивается величиной порядка  $10–13 \cdot 10^6$ . Геномы разных людей по этому ГП обнаруживают удивительное сходство (99.9 %). Стабильные сочетания нескольких соседних аллелей – SNP на одной нити ДНК (гаплотип) позволили использовать их как специфические молекулярные маркеры в программе НарМар (Гаплоидная карта) (см. ниже).

Предполагается, что около половины всех SNP (5 млн) приходится на смысловую (экспрессирующуюся) часть генома. Именно эти замены нередко представляют собой аллельные варианты генов, вызывающих или ассоциированных с различными заболеваниями. Им принадлежит основная роль в ГП человека [5, 7, 8, 9].

На сегодняшний день хорошо известно, что полиморфизм характерен практически для всех генов человека. Установлено, что он имеет выраженную этническую и популяционную специфику. Полиморфизмы, затрагивающие кодирующие части генов, нередко приводят к замене аминокислот и к появлению белков с новыми функциональными свойствами. Существенное влияние на экспрессионную активность генов могут оказывать замены или повторы нуклеотидов в регуляторных (промоторных) областях генов. Наследуемые изменения генов играют решающую роль в определении уникального биохимического профиля каждого человека, в его наследственной предрасположенности к различным МФЗ.

## 2. ПРОГРАММА «ГАПЛОИДНАЯ КАРТА (НАРМАР)»

Решающая роль в изучении ГП принадлежит международному проекту по изучению гаплоидного генома человека – Гаплоидная карта (НарМар).

Цель проекта – получить генетическую карту распределения однонуклеотидных замен (SNP) в гаплоидном наборе всех 23 хромосом человека [11]. Суть проекта состояла в том, что при анализе распределения уже известных SNP у индивидуумов нескольких поколений соседние или близко расположенные в ДНК одной хромосомы SNP наследуются блоками. Такой блок SNP представляет собой гаплотип – набор аллелей, расположенных на одной хромосоме (отсюда и название проекта НарМар). При этом каждый из картированных SNP выступает как самостоятельный молекулярный маркер. По сцеплению таких SNP-маркеров с исследованным признаком (болезнью, симптомом) определяются наиболее вероятные места локализации генов-кандидатов, мутации (полиморфизмы) которых ассоциированы с тем или иным МФЗ. Обычно для картирования выбирают 5 или 6 SNP, тесно сцепленных с уже известным менделирующим признаком. Хорошо охарактеризованные ОНЗ с частотой редких аллелей не менее 5 % получили название маркерных SNP (tagSNP). Предполагается, что, в конечном счете, из примерно 10 миллионов SNP, присутствующих в геноме каждого человека, в процессе выполнения проекта будут отобраны только около 500 000 tagSNP. Но и этого числа вполне достаточно, чтобы перекрыть кар-

той ОНЗ весь геном человека с целью картирования и идентификации новых генов, а также поиска генов-кандидатов, ассоциированных (сцепленных) с различными МФЗ [12].

Благодаря НарМар, которая включает SNP не только уже известных генов, но и SNP еще не идентифицированных генов, ученые получили в руки мощный универсальный навигатор, необходимый для углубленного анализа генома каждого индивидуума, для быстрого и эффективного картирования генов, аллельные варианты которых располагают к различным МФЗ (см. ниже).

Как говорит Фрэнсис Коллинс, директор Национального Института по изучению генома человека (США): «Уже при обсуждении программы «Геном человека» 20 лет назад я мечтал о времени, когда геномный подход станет инструментом для диагностики, лечения и предупреждения тяжелых распространенных болезней, которыми страдают больные, переполняющие наши клиники и кабинеты врачей. Успехи НарМар-проекта позволяют сделать серьезный шаг навстречу этой мечте уже сегодня».

## 3. ГЕНЫ И БОЛЕЗНИ ЧЕЛОВЕКА

Согласно исследованиям заболеваемости у близнецовых пар и данным медицинской генетики только около 1.5 % болезней человека напрямую связаны с мутациями. Это т.н. наследственные болезни. Точность молекулярной диагностики наследственных болезней очень высока и приближается к 100 %.

Все остальные болезни, в т.ч. и такие частые, как сердечно-сосудистые, онкологические, психические и даже инфекционные, являются результатом сочетанного эффекта неблагоприятных внешних факторов и индивидуальных особенностей генома, каким-то образом предрасполагающих конкретного человека к заболеванию. Отсюда и их название – мультифакторные (сочетанные или комплексные) заболевания (МФЗ).

Благодаря расшифровке генома человека, разработке удобных методов картирования новых генов (общее число генов у человека оценивается величиной около 22 000), а также методов идентификации мутаций, проблему диагностики многочисленных и в первую очередь самых частых моногенных наследственных болезней человека (муковисцидоз, гемофилия, миодистрофия Дюшенна/Бэйкера, спинальная мышечная атрофия, иммунодефициты и мн. др.) можно считать решенной [13, 14, 15]. Значительно сложнее обстоит дело с идентификацией генов, вовлеченных в генез МФЗ, т.н. генов «предрасположенности». Согласно существующему определению, «*гены предрасположенности* – это мутантные гены (аллели), которые совместимы с рождением и жизнью, но при определенных неблагоприятных условиях способствуют развитию того или иного МФЗ [14].

В зависимости от участия в метаболических цепях и ассоциации с МФЗ гены предрасположенности условно подразделяют на несколько групп, среди которых выделяют гены системы детоксикации («внешней среды»), гены «метаболические шунты» (гены-триггеры), гены клеточных рецепторов, гены воспаления и иммунной защиты, гены, ассоциированные с конкретными МФЗ [Баранов, 2000, Баранов и др., 2000]. Неблагоприятные аллельные варианты этих генов могут быть причиной атеросклероза, ишемиче-



Рис. 1. Генные сети некоторых частых мультифакторных (сочетанных) заболеваний

ской болезни сердца (ИБС), остеопороза, диабета, бронхиальной астмы, опухолей и пр. Сочетания аллельных вариантов различных генов, обеспечивающих метаболические процессы в норме или вовлеченных в развитие конкретной мультифакториальной патологии, получили название «генных сетей» [16]. В каждой из таких сетей выделяют главные (центральные) гены и дополнительные (вспомогательные) гены, т.н. гены-модификаторы. Дальнейшее развитие концепция генных сетей получила в исследованиях функциональных генетических модулей МФЗ. С этой целью в серии исследований были сопоставлены различные МФЗ и гены, продукты которых участвуют в этиологии и патогенезе этих болезней [17, 18, 19]. Была сформирована сеть МФБ и генов, общих для этих заболеваний, – human disease network – HDN (рис. 1) и, наоборот, генов, вовлеченных в различные болезни, – disease genetic network – DGN (рис. 2). Совмещение HDN- и DGN-карт позволило создать карту т.н. дизизасом – отражающую топологию метаболических сетей и генетики МФЗ (рис. 3). В результате масштабного исследования 1264 МФЗ и ассоциированных с ними 1777 генов [17] было установлено: 1) для каждого МФЗ характерен свой специфический набор генов – генная сеть или т.н. функциональный генетический модуль (ФГМ), в нем различают центральные и периферические гены; 2) большинство МФЗ связаны между собой многими разными генами; 3) 516 МФЗ обнаруживали массу генных связей, т.е. были ассоциированы со многими генами (глухота – 41 ген, лейкемия – 37, рак толстого кишечника – 34); 4) мутации различных генов могут приводить к одинаковым МФЗ, мутации (полиморфизмы) одного гена могут быть ассоциированными с разными МФЗ; 5) мутации центральных (эссенциальных) генов ФГМ чаще ассоциированы с опухолями и являются причиной ранней гибели; 6) мутации (полиморфизмы) периферических генов ФГМ играют основную роль в фенотипической изменчивости и развитии МФЗ; 7) наличие перекрывающихся ФГМ МФЗ доказывает патогенетическую близость разных МФЗ и свидетельствует в пользу представлений о «синтропии» – сочетании



Рис. 2. Функциональные генетические модули разных МФЗ

патогенетически родственных «семейных» МФЗ; 8) гены, входящие в состав ФГМ, по сути являются «синтропными» генами [20], которые функционально близки, но не всегда идентичны генам «предрасположенности». Совпадение многих МФЗ по большому числу ассоциированных генов наглядно продемонстрировано при сравнении генов-кандидатов, ассоциированных с различными аутоиммунными заболеваниями (рис. 4).

Около трети выявленных локусов ассоциированы с двумя, тремя и более заболеваниями. Наличие более 5% общих генов-кандидатов, ассоциированных с целиакией, болезнью Крона, рассеянным склерозом, псориазом, ревматоидным артритом, системной красной волчанкой, сахарным диабетом I типа, неспецифическим язвенным колитом, доказывает патогенетическое сходство этих аутоиммунных заболеваний [21, 22] и позволяет их рассматривать как единую группу синтропных болезней.

Выявление ФГМ каждого МФЗ, идентификация в ней центральных генов и генов-модификаторов, анализ ассоциации их аллелей с заболеванием, разработка на этой основе комплекса профилактических мероприятий для лиц из групп высокого риска, а впоследствии и для конкретного пациента является основной задачей предиктивной (предсказательной) медицины [5].

#### 4. СТРАТЕГИЯ ПОИСКА ГЕНОВ «ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ»

В течение последних десятилетий поиск генов-кандидатов осуществлялся двумя способами – анализом ассоциаций и анализом сцепления.

Основной метод ассоциаций является неравновесие по сцеплению между мутацией и близко расположенным тестируемым маркером [23]. Метод включает несколько этапов: 1) выбор наиболее вероятных генов-кандидатов на основании уже имеющихся данных по этиологии и патогенезу конкретного заболевания, 2) подбор функционально значимых аллелей соответствующих генов, 3) исходя из данных литературы и Интернета, популяционный анализ частот аллелей и генотипов соответствующих генов,

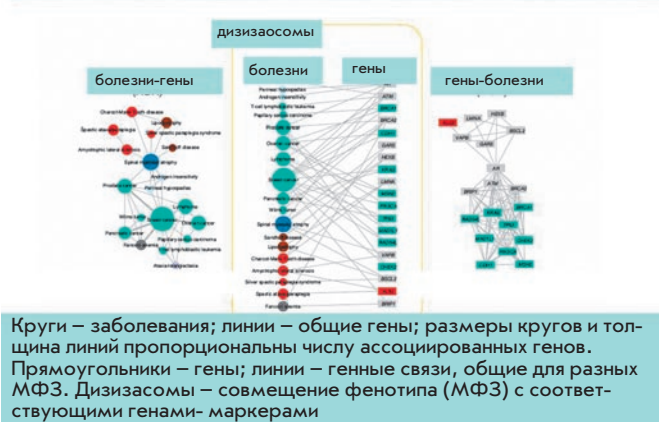


Рис. 3. Топология метаболических сетей и генетика сочетанных заболеваний

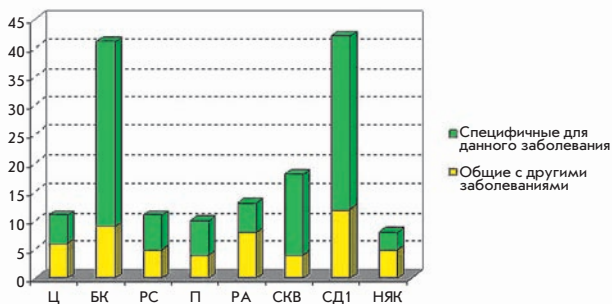


Рис. 4. Число локусов, общих для аутоиммунных заболеваний, и локусов, специфичных для конкретного заболевания. Условные обозначения: Ц – целиакия, БК – болезнь Крона, РС – рассеянный склероз, П – псориаз, РА – ревматоидный артрит, СКВ – системная красная волчанка, СД1 – сахарный диабет I типа, НЯК – неспецифический язвенный колит

4) сравнительный анализ аллельных частот и генотипов этих генов у больных с клинически верифицированным диагнозом и у здоровых лиц той же популяции, подобранных по типу «опыт-контроль».

Исследования проводятся на репрезентативных выборках пациентов и доноров (не менее 100 человек в каждой группе).

Естественно, что такой путь, будучи весьма длительным, трудоемким и дорогостоящим, в то же время никак не гарантирует, что выявленные аллельные различия являются главными в цепи патогенетических механизмов данного заболевания. Он не исключает, что какие-то важные гены и полиморфизмы той же или даже, скорее, другой генной сети, задействованной в заболевании, были пропущены, и что клинически разные формы исследуемой болезни могут иметь разный паттерн генов-кандидатов.

Альтернативная стратегия поиска генов предрасполо-

женности (анализ сцепления) основывается исключительно на позициональном клонировании локуса и не требует наличия предварительной гипотезы о патофизиологии болезни. Первоначально доступным и широко распространенным методом анализа ассоциаций являлся *полногеномный анализ сцепления* – ПГАС (genome-wide linkage study). Метод ПГАС применяется в семьях с несколькими больными сибсами или в расширенных родословных. Он направлен на обнаружение у пациентов блока молекулярных маркеров, которые передаются от родителей больным потомкам, но не передаются здоровым. Метод позволяет локализовать ген на участке 1–10Мб. Такие протяженные участки хромосом, как правило, включают сотни генов, и поиск причинного гена в сцепленном локусе является нелегкой и нередко неразрешимой задачей.

Более продвинутым и широко используемым в настоящее время является метод полногеномного анализа ассоциаций (Genome Wide Association Studies – GWAS). Метод явился настоящим прорывом в генетических исследованиях МФЗ. Он основан на использовании программы НарМар в сочетании с техникой биочипов высокого разрешения. В результате выполнения проекта НарМар в геноме человека было установлено распределение тысяч полиморфных сайтов – однонуклеотидных замен (SNP) и созданы карты гаплотипов – устойчивых сочетаний вариаций SNP в пределах однонитевой (гаплоидной) последовательности ДНК [13]. Другим важным техническим достижением стали гибридационные ДНК – биочипы высокой плотности, позволяющие проводить генотипирование сразу тысяч SNP-сайтов в одном образце ДНК. Зная точное положение каждого SNP на физической карте гаплоидного генома, можно не только идентифицировать ген-кандидат, но и определить все SNP, ассоциированные с МФЗ [24, 25].

Принципом метода GWAS является сканирование сотен тысяч маркеров, расположенных на всех хромосомах человека. Благодаря картам гаплотипов, полученных в рамках проекта НарМар, дизайн современных чипов включает максимальное количество ключевых снипов (tag SNPs) и позволяет оценить частоту как единичных маркеров, так и гаплотипов по всей длине молекулы ДНК. Например, широко используемые чипы фирмы «Иллюмина» (www.illumina.com), включающие в себя 310 000 снипов (Illumina Нар310К), позволяют оценить частоту 81 % частых полиморфизмов в европейской популяции. Следующая разработка той же компании включает в себя 550 000 точечных полиморфизмов (Illumina Нар550К) и покрывает более 90 % частых полиморфизмов [24].

Полногеномный скрининг ассоциаций проводится на больших когортах больных и контроля (более 1500 – 2000 человек), что обеспечивает высокую достоверность ( $p < 0,000005$ ) результатов и включает несколько этапов. На первом – в результате полногеномного скрининга выявляются сотни ассоциаций, большинство из которых, после сотен тысяч независимых тестов, оказываются ложноположительными. На следующем этапе тем же методом анализируются ассоциации в независимой когорте пациентов и контролей. Только результаты, подтвержденные в репликационной когорте, считаются достоверно положительными. Всего в настоящее время методом GWAS проведено сканирование ассоциаций около 300 различ-



ных МФЗ. Результаты этих исследований суммированы на сайте Национального Института здоровья (США) – <http://www.genome.gov/GWastudies/index.cfm?#1>. Данные включают результаты GWAS, полученные с достоверностью  $p < 1 \cdot 10^{-5}$  и содержащие не менее 100.000 SNP. Они регулярно обновляются после публикации очередных результатов [25].

Полногеномный анализ ассоциаций в комплексных заболеваниях очень популярен и успешно применяется в течение последних нескольких лет. Данные о генах, ассоциированных с некоторыми заболеваниями иммунной системы, приведены на рис. 5.

Таким образом, метод GWAS уверенно становится основным в поисках генов-кандидатов при всех МФЗ. К сожалению, эта революционная технология, насколько мне известно, пока малодоступна в России. Учитывая существенные популяционные различия генетического полиморфизма, внедрение технологии общегеномного скрининга аллельных ассоциаций с целью идентификации генов-кандидатов МФЗ в нашей стране представляется настоятельно необходимым.

### 5. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПАСПОРТ

В настоящее время во многих диагностических центрах России широко применяются молекулярные методы с целью диагностики генных болезней, выявления гетерозиготного носительства патологических мутаций в семьях высокого риска, для досимптоматической диагностики болезней с поздней манифестацией и с целью идентификации личности (геномная дактилоскопия). Постепенно набирает силу генетическое тестирование в рамках предиктивной (предсказательной) медицины. Очевидно, что в результате этих исследований происходит накопление данных как о геноме отдельных индивидуумов, так и о целых семьях, т.е. постепенно формируются индивидуальные и семейные базы ДНК-данных. Такая индивидуальная база ДНК-данных и является «генетическим паспортом».

Таким образом, *генетический паспорт представляет собой индивидуальную базу ДНК-данных, отражающую*

*уникальные генетические особенности каждого человека, его предрасположенность к тем или иным наследственным, мультифакториальным и другим заболеваниям [4, 5, 6, 37].*

Информация, содержащаяся в этом поистине уникальном документе, должна помочь избежать жизненных коллизий, связанных с игнорированием индивидуальных особенностей генома, т.е. специфических характеристик своей наследственности. Такие данные позволяют полнее реализовать свои генетические способности и представляют несомненную ценность для потомков.

Повсеместное внедрение в современную медицину методов молекулярной диагностики уже сделало реальной идею генетического паспорта. Он уже существует *de facto*, и число ГТ, составляющих его основу, быстро увеличивается. Вместе с тем приступать к формированию и особенно практическому использованию генетического паспорта можно только при соблюдении достаточно строгих требований. Последние включают:

1. Хорошо изученную геномную сеть каждого МФЗ.
2. Достоверные клинические и популяционные данные, подтверждающие вклад соответствующих генов-маркеров в патогенез МФЗ.
3. Репрезентативные данные для популяции своего региона или соответствующей этнической группы, доказывающие ассоциацию тестируемых генов-маркеров с МФЗ.
4. Взвешенную интерпретацию результатов ГТ наследственной предрасположенности.
5. Рекомендации по результатам ГТ (по данным генетического паспорта).
6. Мониторинг отдаленных результатов состояния здоровья пациента после ГТ и назначения рекомендаций врача-генетика.
7. Конфиденциальность, доступность, юридическую и правовую защищенность для пациента, прошедшего ГТ.

Генетическая карта в полном варианте должна включать результаты исследования не только генов предрасположенности, но и бессимптомного носительства мутаций генов наиболее частых наследственных болезней (гемофи-



Рис. 5. Прогресс в поиске генов МФЗ иммунной системы. Ц – целиакия, БК – болезнь Крона, РС – рассеянный склероз, П – псориаз, РА – ревматоидный артрит, СКВ – системная красная волчанка, СД1 – сахарный диабет I типа, НЯК – неспецифический язвенный колит

### ОБРАЗЕЦ «ГЕНЕТИЧЕСКОГО» ПАСПОРТА

Год рождения – 1997  
Место рождения – Петергоф

<p><b>Совершенно секретно</b></p> <p><b>Кариотип</b></p> <p><b>Досимптоматическая диагностика</b></p> <p>1. Нейродегенеративные заболевания: HD; SCA1; DRPLA; AR; SCA2; MP1</p> <p>2. Семейные раки молочной железы: BRCA1; BRCA2</p> <p>3. Болезнь Альцгеймера: PS-1; PS-2.</p>	<p><b>ПЕРВИЧНОЕ МЕДИКО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ КОНСУЛЬТИРОВАНИЕ</b></p> <p><b>Диагностика гетерозиготного носительства:</b></p> <p>1. Муковисцидоз</p> <p>2. Миодистрофия Дюшенна</p> <p>3. Гемофилия А</p> <p>4. Фенилкетонурия</p> <p>5. Адреногенит. синдром</p> <p>6. Спинальная мышечная атрофия</p>	<p>Наследственная "предрасположенность"</p> <p>Остеопороз - VDR3; COL1A1; CALCR</p> <p>Рак легкого-GSTM1; GSTT1; NAT-2; CYP1A1; p53-6; p53-16; p-53-72</p> <p>Рак простаты AR; p53-6; p53-16; p-53-72</p> <p>Рак молочной железы GSTM1; GSTT1; GSTP1; L-MYC; NAT-2; CYP1A1; CYP17; CYP19; p53-6; p53-16</p> <p>Рак толстой кишки GSTM1; NAT-2</p> <p>GSTT1:</p> <p>Диабет I HLA DR и DQ и DR4; DR3; Mic-A; VDR-3</p> <p>Ишемическая болезнь сердца ApoE; MTHFR; PON FV; FVII; ACE</p> <p>Гипертоническая болезнь AGT; PAII; ACE, ANT; Apo C, ApoB-100</p> <p>Алкоголизм DRD3; DAT1</p> <p>Наркомания DRD2A; DRD2</p> <p>Наследственная тромбофилия MTHFR, FV, PAI-1, FGB, GPIIIa/b, FII</p> <p>Устойчивость к ВИЧ-инфекции 32del/CCR5/+</p>
--	--	---

**МЕДИКО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ КОНСУЛЬТИРОВАНИЕ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ТЕСТИРОВАНИЯ**  
ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ВРАЧА И ПАЦИЕНТА  
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Рис. 6. Вариант «Генетического паспорта» [5,6]

лии, муковисцидоза, фенилкетонурии и др.). В настоящее время диагностические возможности существующих молекулярных лабораторий России, в т.ч. и Санкт-Петербурга, позволяют обеспечить достаточно полный набор необходимых генетических тестов. Один из первых вариантов генетического паспорта был впервые предложен нами еще в 1997 г. (рис. 6)

В настоящее время практическое применение находят только некоторые составляющие генетического паспорта (тестирование гетерозиготного носительства, геномная дактилоскопия, кариотипирование). Реже и только в семьях высокого риска проводится тестирование наследственной предрасположенности к бронхиальной астме, диабету или остеопорозу.

Более продвинутой на пути клинического внедрения является *Генетическая карта репродуктивного здоровья*, которая представляет собой итог многолетних комплексных исследований репродуктивной функции женщин, проводимых в Институте акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта РАМН (Санкт-Петербург) [26]. Карта рекомендована к применению в Центре планирования семьи, а также в родовом и других отделениях института. Она широко используется на консультативных амбулаторных приемах врачами-генетиками и акушерами-гинекологами нашего института. Помимо анализа кариотипа и тестирования на носительство мутаций тяжелых наследственных заболеваний у супругов, планирующих ребенка, важное прогностическое значение имеет исследование женщины по генным панелям заболеваний, осложняющих беременность, развитие плода, роды и послеродовой период (гестозы, привычное невынашивание, варикозная болезнь, фетоплацентарная недостаточность) (рис. 7). Для гинекологов и эндокринологов большой интерес представляет тестирование наследственной предрасположенности к эндометриозу, аденомиозу и постменопаузальному остеопорозу.

Особое внимание обращено на тестирование наследственных форм тромбофилии, для диагностики которой был разработан специальный микробиочип «Фиброчип» [27]. Клинические испытания Генетической карты репродуктивного здоровья (ГКРЗ), проводимые в ИАГ им. Д.О. Отта РАМН, сосредоточены преимущественно на отдельных нозологиях, таких как эндометриоз (прогноз заболевания и выбор оптимальной тактики лечения), наследственные тромбофилии, факторы невынашивания беременности и плацентарной недостаточности, гестоз (прогноз и профилактика). Накапливаемая в ходе проспективного тестирования информация о генетических маркерах акушерской патологии является основанием для более широкого внедрения ГКРЗ в клиническую практику.

Согласно рекомендациям ВОЗ, генетическое тестирование должно проводиться с учетом добровольного, сознательного согласия тестируемого, т.е. по достижении им совершеннолетия. Формально это означает, что важная генетическая информация может стать доступной сравнительно поздно, когда ее польза для обследуемого и его близких родственников уже в значительной мере утрачена. Однако, принимая во внимание значение этих данных для здоровья ребенка, гармоничного формирования его личности, рационального питания, эффективного образования, спортивных занятий, оптимальной профориентации

### ГЕНЕТИЧЕСКАЯ КАРТА РЕПРОДУКТИВНОГО ЗДОРОВЬЯ



Рис. 7. Вариант Генетической карты репродуктивного здоровья [26]

и возможности упредить развитие ряда болезней с поздней манифестацией, составление такого генетического паспорта в раннем возрасте представляется вполне оправданным уже сегодня. Возможный вариант генетической карты ребенка, основанный на результатах исследования генных ассоциаций, приведен на рис. 8.

Нельзя исключить, что по мере решения этических и социальных проблем, связанных с исследованиями генома человека, генетическое тестирование получит все большее распространение и в более раннем возрасте, чем рекомендуется в настоящее время. Во всяком случае, в семьях с высоким риском диабета I типа, бронхиальной астмы, синдрома внезапной смерти, с нарушениями сердечной проводимости и ритма, метаболическим синдромом и ожирением, а также при ряде других нозологий вполне оправданным представляется упреждающее генетическое тестирование уже в раннем возрасте [37]. Естественно, что проводиться оно может только с согласия родителей, по направлению врача-педиатра и после консультации семьи врачом-генетиком, компетентным в вопросах предиктивной медицины.

Стремительно накапливается информация и о генах-маркерах, тестирование аллельных вариантов которых позволяет оценить пригодность подростка к тому или иному виду спорта. В настоящее время имеется информация о почти 150 различных генах, контролирующих физическое развитие человека, важных для правильного занятия фитнесом и для отбора потенциально перспективных спортсменов. Полученные результаты позволили приступить к формированию собственного варианта генетической карты спортсмена, включающего тестирование некоторых генов, определяющих физические характеристики человека.

Несмотря на известные ограничения юридического и морально-этического плана, недостаток информации о генных сетях различных метаболических процессов и мультифакториальных болезней, отсутствие убедительной статистической информации и несовершенство клинической интерпретации результатов генетического тестиро-

вания, составление генетического паспорта любого объема для дееспособных граждан следует приветствовать. Данный медицинский документ может оказать существенную помощь при проведении экспертизы состояния здоровья, а также оценке потенциального риска развития ряда МФЗ у членов семьи высокого риска [37].

Таким образом, несмотря на очевидное несовершенство современной предиктивной медицины, генетическое тестирование семей высокого риска по некоторым тяжелым МФЗ, а также спортсменов-профессионалов, людей экстремальных профессий и лиц, заинтересованных в информации о своем геноме, представляется вполне реальным. Очевидна большая практическая значимость и Генетической карты репродуктивного здоровья.

## 6. ОСНОВНЫЕ ПРОБЛЕМЫ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ МФЗ

Тестирование генных ассоциаций, т.е. поиск генов-кандидатов, сцепленных с различными МФЗ, уже приобрело массовый характер и широко представлено во всем мире, включая ведущие лаборатории и генетические центры России. Согласно мировым данным, тысячи полиморфных сайтов тестируются ежедневно для установления ассоциации с болезнями [28]. Для многих частых МФЗ уже идентифицированы или находятся в стадии изучения около 100 главных генов-кандидатов, в каждом из которых имеется несколько полиморфных сайтов, влияющих на функции гена и его продуктов.

В последние годы для поиска генов-маркеров МФЗ все шире применяется метод полногеномного поиска ассоциаций (GWAS) [29]. С помощью этого метода уже идентифицированы сотни новых генов-кандидатов и анонимных полиморфизмов, сцепленных с наиболее частыми МФЗ [29]. Сравнение особенностей распределения аллельных вариантов у больных и здоровых уже привело к понятию «*геномный профиль МФЗ*», соответствующий *распределению по геному SNP-аллелей, характерному для определенного заболевания*. При этом обязательным становится даже идентификация самих генов-маркеров, а результаты записываются по номерам tagSNP, обнаруживших при полногеномном скрининге достоверное сцепление с МФЗ. Например, в обширном перспективном исследовании исландской популяции выявлены 22 варианта геномных профилей риска рака простаты. Наибольшее сцепление ( $OR = 1.23$ ;  $P = 6.7 \cdot 10^{-12}$ ) было установлено для SNP rs11228565 локуса 11q13. Наличие четырех вариантов риска SNP rs10934853 (3q21.3); rs16902094 и rs445114 (8q24.21) rs8102476 (19q13.2) увеличивало вероятность рака простаты у носителей в 2.5 раза в сравнении с популяционным [30]. Возникли и активно рекламируются коммерческие генные тесты, в т.ч. и «*индивидуальные геномные профили*», различными диагностическими центрами Америки (Celera, Myriad genetics, Decode, Navigenics, 23andme) и Западной Европы (Sciona, Gendia) [31]. При этом ассоциации многочисленных генов-маркеров и полиморфных локусов с заболеванием остаются недоказанными, а более 5 % уже выявленных ассоциаций оказываются случайными [28]. По мнению многих специалистов, в молекулярной медицине и медицинской генетике возникла достаточно тревожная ситуация, когда *коммерциализация и бизнес начинают опережать науку*.

Главные проблемы, возникшие на пути внедрения результатов ГТ наследственной предрасположенности в клиническую практику, следующие:

1. Полнота выявления всех генов-кандидатов генной сети (ФГМ) МФЗ.
2. Доказательство достоверности их ассоциации с МФЗ.
3. Медицинская оценка результатов ГТ.
4. Клиническая значимость предиктивного (упреждающего) ГТ.

### 6.1. ПОЛНОТА ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ ФГМ КОНКРЕТНОГО МФЗ

Метод анализа ассоциаций (см. раздел 3) в лучшем случае позволяет выявить наиболее очевидные в плане патогенеза заболевания генов-кандидатов и провести сравнительный анализ частот их аллелей в когортах больных и популяционном контроле.

Метод полногеномного анализа сцепления позволяет более детально установить локусы, сцепленные с конкретным МФЗ, однако достаточно протяженные размеры этих локусов зачастую сильно осложняют возможности точной идентификации в них важных генов-кандидатов.

Основные надежды в решении данной проблемы сегодня возлагаются на метод полногеномного исследования ассоциаций – метод GWAS. Использование биочипов высокой плотности (более 500 000 SNP) позволяет с высокой достоверностью перекрыть весь геном и, таким образом, получить информацию о всех SNP, сцепленных с МФЗ. Однако множество таких ассоциаций в действительности оказываются случайными и могут быть дискриминированы только в результате повторного (репликативного) GWAS-анализа, проведенного на других когортах больных с тем же МФЗ и других группах популяционного контроля. Кроме того, ассоциация в том или ином участке ДНК далеко не всегда совпадает с наличием в нем соответствующего гена-кандидата и отнюдь не обязательно означает идентификацию мутации, ответственной за предрасположенность



Рис. 8. Вариант «Генетической карты здоровья ребенка» [37]

к МФЗ. В большинстве случаев выявленный SNP расположен в межгенных участках ДНК и, по сути, может рассматриваться лишь как молекулярный маркер, сцепленный с одним или даже несколькими соседними генами. Тем не менее на сегодняшний день метод GWAS, дополненный секвенированием сцепленных локусов, анализом экспрессии входящих в него генов, рассматривается как наиболее эффективный метод идентификации генов-кандидатов, составляющих ФГМ каждого МФЗ. Вместе с тем идентификация новых генов-маркеров, ассоциированных с МФЗ, нередко сопряжена с пересмотром величины первоначального индивидуального риска, что было наглядно продемонстрировано при геномном сканировании предрасположенности к диабету II типа [32].

Возможности тестирования наследственной предрасположенности не только по аллельным вариантам генов-предрасположенности, но и по геномному профилю tag-SNP [30] значительно укрепляет позиции предиктивной медицины.

## 6.2. ДОСТОВЕРНОСТЬ АССОЦИИИ ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ С КОНКРЕТНЫМ МФЗ

В настоящее время уже существует около 1024 клинических генетических тестов на МФЗ, и более 300 генетических тестов проходят доклинические и клинические испытания [33]. Для многих МФЗ уже идентифицированы некоторые «главные» гены, вовлеченность которых в ту или иную патологию подтверждена исследованиями многих лабораторий на репрезентативных группах больных. К таковым, например, относятся болезнь Альцгеймера (APOE4), диабет II типа (PPARG, TCF7L2, KCNJ11), старческая дегенерация желтого пятна сетчатки (CFH), системная красная волчанка (JRF5), рак простаты (регион JF1H), сахарный диабет I типа (IL2RA, CD25, RPTN22), аутоиммунный тиреоидит (CTLA4), болезнь Гиршпрунга (RET), болезнь Крона (NOD2, CARD15), ревматоидный артрит (RPTN22) [8, 34]. Тем не менее отношение к ГТ остается достаточно скептическим, что в значительной мере определяется отсутствием строгих статистических доказательств достоверности результатов ГТ.

Одной из важных причин такого несоответствия являются сравнительно небольшие выборки групп больных и здоровых. В лучшем случае они ограничиваются сотнями субъектов, тогда как для получения статистически достоверных данных требуется сравнительный генетический анализ нескольких тысяч здоровых и больных [28].

Другой причиной вариабельности генных ассоциаций могут быть популяционные различия аллельных частот для одних и тех же генов-кандидатов. Не случайно выявленные аллельные различия, доказывающие значимость той или иной ассоциации при объединении данных разных работ, выполненных на группах больных, и контроля других популяций нередко усредняются и становятся статистически недостоверными.

Необходимость больших выборок диктуется сравнительно невысокой частотой величины относительного риска – OR, которая показывает, насколько чаще встречается изучаемое заболевание у лиц с определенным аллелем или набором разных аллелей соответствующих генов-маркеров по сравнению с индивидуумами с другими

аллелями тех же генов-кандидатов [35]. Обычно для уже известных генов-маркеров, ассоциированных с МФЗ, величина OR не превышает 1.5, а чаще находится в пределах 1.16–1.2. Так, сочетание нескольких неблагоприятных аллелей гена-кандидата RPTN22 при диабете и системной красной волчанке и гена NOD2 при болезни Крона увеличивают относительный риск заболевания (OR) в 2–3 раза. Для большинства других ассоциаций OR варьирует от 1.1 до 1.5. [22]. В силу этого реальный вклад каждого гена-маркера в развитие МФЗ сравнительно невелик. Поэтому для строгого доказательства наличия ассоциации требуются обширные генетические исследования. Считается, что для доказательства 90 % вероятности какой-то ассоциации между геном и заболеванием при RR, равном 1.25, требуется исследование 5000 больных и не менее 5000 человек контрольной группы. При этом предлагается также увеличить в 10 000 раз уровень значимости ( $p < 0.00005$  вместо обычного  $p < 0.05$ ) [28]. Появление метода GWAS кардинально меняет ситуацию с проблемой достоверности предиктивного ГТ. Так, при оценке риска инфаркта миокарда путем ГТ 85 SNP соответствующих генов-кандидатов достоверность выявленных ассоциаций возросла до  $p < 0.0000001$  [36].

Другим важным фактором, доказывающим состоятельность выявленной ассоциации, является ее репликативность, т.е. воспроизводимость результатов ГТ в работах других исследователей.

Причины вариабельности генетического полиморфизма весьма многообразны:

- генетическая стратификация изучаемой популяции (наличие в ней субпопуляций с исходно различной частотой анализируемых аллелей) [28];

- частоты аллелей в разных популяциях могут варьировать, и их вклад в патогенез конкретного МФЗ может быть различным;

- патогенетические различия МФЗ могут быть обусловлены особенностями действия разных внешних факторов в разных географических условиях;

- неточности клинического диагноза, приводящие к ошибкам при формировании клинических групп;

- аллели, ассоциированные с одним и тем же МФЗ, в разных популяциях могут быть разными.

Существует и ряд других факторов, существенно затрудняющих правильную оценку наблюдаемой ассоциации генотип-фенотип, даже если она вполне достоверная статистически:

- отмеченная ассоциация может относиться не к идентифицированному гену или SNP-маркеру, но к гену или локусу (аллелю), тесно сцепленному с еще неизвестным локусом или аллелем, продукт которого вовлечен в патогенез МФЗ;

- выявленная ассоциация может, в действительности, касаться не самого гена-кандидата, а другого гена, продукт которого функционально компенсирует эффект мутантного гена (*эпистатическое взаимоотношение генов*);

- практически малоизученными остаются не только генные взаимодействия, но и взаимодействия генов-кандидатов с факторами внешней среды;

- патогенез любого МФЗ может быть результатом нарушения функции генов не одной, а чаще разных генных сетей;

- наряду с типичными для МФЗ полигенными формами нередко встречаются и отдельные моногенные формы (остеопороз, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, различные онкологические заболевания) [35].

Естественно, что все перечисленные факторы существенно затрудняют корректную идентификацию генов-маркеров и оценку их объективного вклада в патогенез заболевания.

Признавая все эти ограничения и реально существующие сложности в идентификации генов – маркеров МФЗ, важно обратить внимание на следующие обстоятельства.

Для всех МФЗ взаимоотношения генотип-фенотип всегда носят вероятный характер, а не являются строго детерминированными, т.е. точность ДНК-диагностики МФЗ, в отличие от моногенных болезней, никогда не приблизится к 100 %.

Группы больных и здоровых при анализе методом GWAS включают тысячи человек, что гарантирует высокую достоверность полученных результатов.

В своем подавляющем большинстве маркерные гены и локусы, выявленные с GWAS, всегда включают ассоциации, ранее установленные другими методами.

Эти положения нуждаются в дальнейших уточнениях и проверках, однако уже сейчас они дают основание для более масштабных доклинических и клинических испытаний уже идентифицированных генов-кандидатов частых МФЗ.

Наиболее рациональным на современном этапе развития предиктивной медицины в России представляется сопоставление уже известных генов-кандидатов МФЗ, идентифицированных в работах отечественных авторов, с соответствующими панелями генов-кандидатов, выявленными методом GWAS (1); тестирование аллельных частот новых главных генов-кандидатов на уже существующих выборках больной-здоровый (ДНК-банки) (2); формирование новых панелей генов МФЗ исходя из полученных данных (3).

### 6.3. ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ ПРЕДИКТИВНОГО ГТ

Оценка результатов генетического тестирования должна проводиться с учетом уже накопленных знаний по генным сетям конкретных МФЗ, популяционных, гендерных и возрастных особенностей частот полиморфных аллелей изучаемых генов [37]. Учитывая сугубо вероятностный характер генетических прогнозов при тестировании наследственной предрасположенности к МФЗ, определенную помощь в оценке риска наследственной предрасположенности уже сегодня может дать достаточно простой метод балльных оценок, который применяется в ряде западных стран (Harvard School of Public Health) и уже используется в некоторых отечественных центрах, проводящих генетическое тестирование [38, 39, 40]. Суть метода заключается в следующем: каждый вариант генотипа оценивается в условных баллах в зависимости от того, являются ли выявленные аллели протективными или, наоборот, предрасполагающими к развитию патологии. С этой целью аллелю с измененной функциональной активностью гена присваивается 1 балл, нормальному (частому) аллелю дикого типа – 0 баллов. Затем записывается генотип по каждому тестируемому гену-кандидату, полученные величины складываются и делятся на число протестированных генов. Условно оценивают риск

заболевания как средний, низкий или высокий. При наличии патогенетически сложных МФЗ, включающих несколько разных метаболических цепей, подсчет ведется для каждой генной сети отдельно, а полученные оценки складываются. Некоторые варианты балльных оценок помимо обчета баллов генотипов включают также условные баллы для различных экзогенных факторов (вредные воздействия, привычки, прием лекарственных препаратов и пр.), антропометрические показатели, а также физическую активность, пол, вес [26].

Информация по результатам ГТ подготавливается врачом-генетиком совместно со специалистом, проводившим молекулярный анализ, и передается лечащему врачу и пациенту. Сопоставление этого заключения с результатами клинических, лабораторных и инструментальных исследований позволяет более объективно оценить риск развития того или иного МФЗ и предложить максимальную эффективную программу его профилактики и лечения.

Ответ может быть более объективным, если есть возможность сравнить полученные результаты с данными по генетическому тестированию близкого родственника, уже имеющего данное МФЗ. Однако в любом случае ответ будет носить сугубо вероятностный характер. Подробно метод балльной оценки результатов ГТ приведен в наших методических рекомендациях, посвященных генетической карте репродуктивного здоровья [26].

Существенную помощь в правильной интерпретации результатов ГТ могут оказать специальные компьютерные программы. Таковые уже разработаны и широко используются для сравнения геномных профилей больных с МФЗ, контрольной группы и пациента, что позволяет оценить риск наследственной предрасположенности к МФЗ конкретного человека [29]. Создана карта, которая облегчает врачам понимание результатов ГТ, помогает находить генные вариации, соответствующие определенным заболеваниям, и отслеживать их передачу по наследству. Считается, что такая карта поможет снизить стоимость поиска генов предрасположенности к тому или иному МФЗ, а также сделает реальным разработку индивидуального лечения [41]. Нет сомнений в том, что создание подобной компьютерной программы для оценки результатов ГТ в России могло бы так же существенно ускорить внедрение предиктивной медицины в клиническую практику.

Согласно зарубежным данным, уже разработаны и достаточно широко используются ГТ для оценки наследственной предрасположенности к сердечно-сосудистым заболеваниям, венозным тромбозам, гиперлипидемии, атеросклерозу [41]. Важно подчеркнуть, что эти исследования пока не имеют статуса тестов, рекомендуемых для клинического применения, однако они уже начали применяться клиницистами. В таком же состоянии находятся уже более 1000 предиктивных ГТ, многие из которых проходят доклинические и клинические испытания. Объектами ГТ являются такие гены, как APOE4, гомозиготность по которому в 14 раз увеличивает риск болезни Альцгеймера, ген Filaggrin, мутации которого R501X или 2282del14 в 4 раза увеличивают риск атопической экземы и тяжелых форм бронхиальной астмы, неблагоприятные аллели гена CD-KN22a2b (на 64 % увеличивают риск ИМ) и 4a/4b аллели гена IN, наличие которых вдвое увеличивает риск диабета

II типа. Однако клиническое значение этих генетических тестов остается неясным, их полезность для врачей и пациентов нуждается в более строгих доказательствах [36].

16 августа 2007 г. успешно прошел сертификацию и получил официальное одобрение Администрации по Контролю за пищевыми продуктами и лекарственными препаратами США (Food & Drug Administration) первый предиктивный генетический тест для расчета индивидуальной дозы антикоагулянта варфарина. Тест включает тестирование генов CYP2C9, VKORC1 с учетом возраста, пола и веса пациента.

В 2008 г. Комиссией EuroGentest в Европе разработано положение о стандартизации ГТ и подготовлена необходимая документация для сертификации тех генетических анализов, которые по результатам клинических испытаний могут быть уже переведены в разряд ГТБ, рекомендованных для клинического применения [Nippert et al., 2008].

#### 6.4. РЕКОМЕНДАЦИИ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ

Реальная польза от ГТ может быть только в том случае, если оно завершается полноценной консультацией квалифицированного специалиста по медицинской генетике, с предоставлением соответствующих рекомендаций лечащему врачу и пациенту. ГТ может иметь практическую значимость при соблюдении следующих условий: результаты ГТ основаны на анализе генов, ассоциация которых с соответствующим заболеванием показана в популяции данного региона (1), обследуемый является членом семьи высокого риска, где уже есть больной с данной патологией (2), данные ГТ прошли адекватный статистический анализ (3). Эффективность использования такой информации во многом определяется уровнем генетических знаний врачей, их умением применять полученные данные для диагностики, профилактики и лечения заболевания, а также готовностью самого пациента следовать рекомендациям врачей по результатам генетического тестирования. [39]. Но даже при соблюдении этих условий результаты ГТ наследственной предрасположенности следует интерпретировать очень осторожно. По возможности, ГТ должно быть дополнено соответствующими биохимическими анализами, позволяющими оценить функциональную активность исследованных генов. Следует помнить, что более объективная информация может быть получена при тестировании генов, контролируемых лишь какой-то один метаболический процесс, т.е. относящихся к одной генной сети. Так, уже сегодня на основании генетического тестирования достаточно объективно можно оценить функциональное состояние систем детоксикации, свертывания крови, липидного или углеводного обменов, ренин-ангиотензиновой системы и др. Значительно более сложными для оценки результатов и прогноза наследственной предрасположенности являются МФЗ, обусловленные повреждениями сразу нескольких генных сетей.

Основные трудности широкого внедрения предиктивной медицины в клиническую практику связаны с отсутствием объективных данных, доказывающих полезность для пациента досимптоматического тестирования наследственной предрасположенности к МФЗ.

Согласно Генетическому Досье (Gene Dossier), недав-

но разработанному Службой генетического тестирования Великобритании (United Kingdom Genetic Testing Network [www.ukgtn.nhs.uk](http://www.ukgtn.nhs.uk)), сертификация каждого нового ГТ должна включать информацию об аналитической точности использованного молекулярно-генетического метода (1), клинической достоверности ГТ, т.е. о его способности диагностировать или предсказывать наличие или отсутствие определенного фенотипа (2), клинической полезности ГТ (3), его этическом, юридическом и социальном соответствии, т.е. ГТ должен быть ориентирован на определенную популяцию и нацелен на решение конкретной задачи (4) ([www.labtestonline.org.ru](http://www.labtestonline.org.ru)).

Британский Фонд Wellcome Trust, ранее финансировавший программу Геном человека, в 2008 г. начал финансирование проекта, направленного на улучшение и усиление доказательной базы генетического тестирования, а также подготовку справочника для координации и интеграции в клиническую практику ГТ с необходимыми разъяснениями их полезности для врачей и пациентов. При этом оценка клинической полезности ГТ приравнивается к фазе III клинических испытаний, однако остается не ясным, должны ли они оплачиваться государством или фирмами, разрабатывающими и рекламирующими ГТ [43].

Окончательная цель проекта – перевести предиктивную медицину из области научных исследований особенностей генетического полиморфизма и идентификации генов – маркеров МФЗ на уровень доказательной медицины

Итогом всякого ГТ должны быть не только информация об особенностях аллельных вариантов генов той или иной метаболической цепи, но и соответствующие рекомендации для пациента и врача [44]. «Генетическая» переориентация всего здравоохранения уже происходит в развитых странах Западной Европы и Америки. В скором будущем она достигнет и России. Значительное повышение уровня генетических знаний, особенно в области предиктивной медицины, у врачей всех специальностей – важнейшее условие эффективного внедрения достижений медицинской генетики и геномики в систему здравоохранения РФ.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Благодаря впечатляющим успехам геномики, появлению новых, высокоэффективных методов молекулярного анализа стремительное развитие получил поиск генов-маркеров, ассоциированных с МФЗ. В результате были идентифицированы тысячи новых генов-маркеров, аллельные варианты которых предрасполагают к развитию патологических процессов (1); созданы генетические панели большинства частых хронических заболеваний (2); идентифицированы гены-маркеры, определяющие тяжесть течения болезни, предрасположенность к тем или иным осложнениям (3).

Беспрецедентные по масштабу исследования по генотипированию представителей разных рас, национальностей и этнических групп потребовали совместной напряженной работы клиницистов и молекулярных биологов. Итогом их работы стали многочисленные банки ДНК-данных, содержащие информацию обо всех уже известных мутациях и вариациях ДНК, ассоциированных с хроническими заболеваниями (4).

Обширная информация по генотипированию частых хронических заболеваний у жителей РФ накоплена к этому

времени и во многих научных центрах РФ (Институт медицинской генетики СО РАМН (Томск), Медико-генетический научный центр РАМН (Москва), Институт биохимии и генетики РАН (Уфа), Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН (Москва), Институт молекулярной генетики РАН (Москва), Институт молекулярной медицины РАМН и др.). Только в нашей лаборатории НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта СЗО РАМН (Санкт-Петербург) за это время были изучены частоты аллельных вариантов 80 генов-маркеров у 5000 больных с различными частыми МФЗ и у такого же числа человек из групп контроля.

Как индивидуальная база ДНК-данных, генетический паспорт (ГП) уже существует, постепенно усложняясь по мере выявления все новых генных маркеров, увеличения числа генных сетей и панелей генов предрасположенности, определяющих наследственную склонность к МФЗ. Если на ранних этапах ГП представлял собой достаточно простую карту, включающую результаты тестирования около 100 генов-маркеров, соответствующих генным панелям 15–20 частых хронических МФЗ, то после появления технологии GWAS число генов-кандидатов стало стремительно нарастать. Для каждого заболевания с помощью этой технологии определяется свой характерный *генетический профиль*, соответствующий распределению по геному более 30–500 000 SNP в карте однонуклеотидных замен. Сравнение генетических профилей больных и здоровых с таковым у пациента позволяет с высокой степенью достоверности определить предрасположенность тестируемого к соответствующему заболеванию.

Очевидно, что к результатам ГТ пока следует относиться с большой осторожностью. Клиническую полезность такого тестирования даже при использовании технологии GWAS еще требуется доказать. Особую озабоченность вызывает отсутствие сведений о том, каким образом и какие именно факторы внешней среды провоцируют развитие МФЗ у конкретного человека. С этой целью перед научным сообществом уже поставлена задача количественно оценить генетические и экзогенные факторы риска и их комбинации в патогенез МФЗ [45]. Несмотря на все отмеченные сложности, внедрение предиктивной медицины в клиническую практику научно оправдано и стратегически неизбежно.

В заключение отмечу, что появление новых, высокоэффективных методов секвенирования ДНК сделало реальным полное «прочтение» текста индивидуального генома. Особенно перспективно в этом отношении массивное параллельное секвенирование [46]. Недавно появилось сообщение, что каждый американец уже может получить свой геном всего за 50 000 долл., т.е. в 20 раз дешевле, чем в 2007 г. Следует, однако, отметить, что полностью секвенированный индивидуальный геном вряд ли в обозримом будущем заменит генетический паспорт, который значительно удобней и практичней для повседневной работы как специалиста-генетика, так и врача, использующего данные ГТ. Полногеномный сиквенс, безусловно, будет иметь значение для более углубленного анализа уникальных особенностей индивидуального генома, т.е. он может

играть роль универсального генетического справочника каждого человека, тогда как ГП будет содержать информацию о состоянии генов – предрасположенности частых МФЗ. Предполагается, что в течение ближайших 2–3 лет каждый человек сможет получить полную карту своего генома всего за 1000 долл., а стоимость генетического паспорта с комментариями специалиста-интерпретатора составит около 300 долл. Следовательно, наряду с обычными важнейшими тестами медицинского и антропометрического обследования личная медицинская карта каждого человека будет включать и результаты ГТ, число которых будет неизменно увеличиваться. При этом, по мнению академика В.П. Пузырева, ГТ будут не подменять, а лишь дополнять результаты других лабораторных исследований [20].

Предвидя такое развитие событий, в странах Западной Европы и Америки уже ведется большая работа по интеграции геномики в исследование национального (общественного) здоровья, политику и практику. Знания генома необходимо интегрировать в доктрину здоровья каждой страны, при этом основное внимание отводится именно предиктивной медицине. Для этого, однако, еще надо разобраться, какую клиническую ценность представляет «повышенная генетическая чувствительность» и каким образом количественно, с соблюдением принципов доказательной медицины, оценить генетические и экзогенные риски [45].

Проникновение геномики в общество и в медицину можно ускорить, но остановить уже нельзя. В полной мере это относится и к предиктивной медицине. Внедрение технологии общегеномного скрининга для идентификации всех генов-кандидатов МФЗ, сопоставление индивидуального профиля аллельных вариантов генов-кандидатов обследуемого с таковыми у больных данным МФЗ и у заведомо здоровых, подкрепленные отдаленными результатами проспективного генетического тестирования, откроют человечеству широкий путь в новую и так много обещающую эру предиктивной медицины. Главная задача современной геномики – оценить значение результатов ГТ для клиники, определить условия их внедрения в практическую медицину. Возможные пути решения данной проблемы в РФ включают: сопоставление имеющихся результатов ГТ МФЗ отечественных популяций с мировыми данными их полногеномного скрининга (1), создание репрезентативных (не менее 1000 образцов) ДНК-банков – на каждое МФЗ (2); тестирование на отечественных коллекциях ДНК новых генов-кандидатов (3); создание центров по внедрению полногеномного скрининга GWAS (4). ●

*Авторы выражают глубокую признательность сотруднику отдела биомедицинской генетики Университета медицинского центра г. Утрехт (Голландия) Александре П. Жернаковой за ценные советы при работе над рукописью и возможность использования ее данных по Общегеномному скринингу ассоциаций ряда аутоиммунных заболеваний.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Collins F.S., McKusick V.A. // J.Am. Med. Ass. 2001.V. 285. № 5. P. 540–544.
2. Collins F.S. Shattuck. // New Engl. J. Med. 1999. V. 341. №1. P. 28–37.
3. Бочков Н.П. // Рос. Мед. Вестн. 2001. № 4. С. 4–13.
4. Баранов В.С., Киселев Л.Л. Геном человека и молекулярная медицина. В кн.: Геномика – медицине. / Ред. В.И. Иванов, Л.Л. Киселев. М.: ИКЦ «Академкнига», 2005. С. 4–13.
5. Баранов В.С., Баранова Е.В., Иващенко Т.Э., Асеев М.В. // Геном человека и гены предрасположенности. Введение в предиктивную медицину. СПб.: «Интермедика», 2000. 263 стр.
6. Баранов В.С., Асеев М.В., Баранова Е.В. // Природа. 1999. № 3. С. 17–27.
7. Пузырев В.П. // Мед. Генетика. 2003. Т. 2. № 12. С. 498–508.
8. Пузырев В.П., Фрэйдин М.Б., Кучер А.Н. Генетическое разнообразие народонаселения и болезни человека. Томск: Печатная мануфактура, 2007. 320 с.
9. Пузырев В.П., Степанов В.А. Патологическая анатомия генома человека. Новосибирск: Наука, 1997. 223 с.
10. Фогель Ф., Мотульски А. Генетика человека. М.: Мир, 1989. Т. 1. 308 с.
11. The Intern.HapMap Project // Nature. 2003. V. 426. P. 789–796.
12. Gabriel S.B., Schaffner S.F., Nguyen H. et al. // Science. 2002. V. 296. № 5576. P. 2225–2229.
13. Горбунова В.Н., Баранов В.С. Введение в молекулярную диагностику и генотерапию наследственных заболеваний. СПб.: Специальная литература, 1997. 287 с.
14. Баранов В.С. // Вестник РАМН. 2000. № 10. С. 27–37.
15. Горбунова В.Н. Молекулярные основы медицинской генетики. Интермедика СПб, 1999. 213 с.
16. Колчанов Н.А., Подколдная О.А., Игнатъева Е.В. и др. // Вестник ВОГИС. 2005. Т. 9. № 2. С.179–199.
17. Kwang-II Goh, Cusick M.E., Valle D. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2007. V. 104. № 21. P. 8685–8690.
18. Lee D.S., Park J., Kay K.A. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. № 29. P. 9880–9885.
19. Hidalgo C.A., Blumm N., Barabasi A-L., Christakis N.A. // A dynamic network approach to the study of human phenotype. PLoS Computational Biology www.ploscompbiol.org 2009. V. 5. is41-11. e1000353.
20. Пузырев В.П. // Мед. Генетика. 2008. Т. 8. № 9. С. 3–9.
21. Zhernakova A., van Diemen C.C. and Wijmenga C. // Nat Rev Genet. 2009. 10, 43–55.
22. Zhernakova A. and Wijmenga C. HLA and Non-HLA Genes in Celiac Disease. In Fasano, A. (ed) // Frontiers in Celiac Disease. Karger, Basel. 2008. V. 12. P. 32–45.
23. Аульченко Ю.С., Аксенович Т.И. // Вестник ВОГИС. 2006. № 10. С. 189–202.
24. Xavier R.J., Rioux J.D. // Nat. Rev. Immunol. 2008. V. 8. P. 631–43.
25. Hindorf L.A., Sethupathy P., Junkins H.A., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2009. V. 106. P. 9362–7.
26. Баранов В.С., Айламазян Э.К. (ред.) Определение наследственной предрасположенности к некоторым частым заболеваниям при беременности. Генетическая карта репродуктивного здоровья. Методические рекомендации. СПб., 2009. 67 с.
27. Глогов А.С., Наседкина Т.В., Иващенко Т.Э. и др. // Молекулярная биология. 2005. Т. 39. № 3. С. 403–412.
28. Colhoun H.M., McKeigue, Smith G.D. // Lancet. 2003. V. 361. P. 865–871.
29. Seng K.Ch., Seng Ch. K. // Europ. J. Hum. Genet. 2008. V. 16. P. 554–564.
30. Gundmundsson J., Sulem P., Gudbjartsson D.F., Blondal Th., Gylfason A. et al. // Nature Genetics. 2009. V. 41. P. 1122–1126.
31. Bouchie A.A. // The Scientist. 2006. V. 20. № 4. P. 78.
32. Mihaescu R, van Hock M., Sindjbrand E.M., Uitterlinden A.G. et al. // Genet. Med. 2009. V. 11. № 8. P. 588–594.
33. Berry T.A., Wiliams J.K. // Genetic Testing. 2007. V. 11. № 2. P. 111–117.
34. Diego C.D., Alcantara M., Valle J. et al. // Genet. Testing. 2006. V. 10. № 3. P. 178–185.
35. Гинтер Е.К. Медицинская генетика. М.: Медицина, 2003. 447 с.
36. Meltzer D., Hogarth St., Liddel K., Ling T., Sanderson S., Zimmern R.L. // Brit. Med. J. 2008. V. 336. P. 590–593.
37. Баранов В.С. (ред.) Генетический паспорт – основа индивидуальной и предиктивной медицины. СПб.: Изд-во «Н-Л», 2009. 527 с.
38. Минайчева Л.И., Степанов В.А., Пузырев В.П., Назаренко Л.П., Спиридонова М.Г., Макеева О.А. Проблемы внедрения достижений геномной медицины в клиническую практику. В кн.: Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике. // Новосибирск: Альфа Виста, 2004. С. 115–120.
39. Погрбенкова В.В., Макеева О.А. Анализ востребованности услуг по генетическому тестированию болезней с наследственной предрасположенностью среди населения и врачей г. Томска. В кн.: Генетика человека и патология. Томск: Печатная литература, С. 103–105.
40. Глогов А.С., Иващенко Т.Э., Образцова Г.И., Наседкина Т.В., Баранов В.С. // Молекулярная биология. 2007. Т. 41. № 1. С. 18–25.
41. Humphries S.E., Ridker P.M., Talmud P.J. // Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol. 2004.
42. Nippert I., Krisoffersson U., Schmidtke J. et al. // Europ. J. Human Genetics. 2008. V.16. Suppl. 2. P. 421.
43. Furness P., Zimmern R.L., Wright C., Adams M. The evaluation of diagnostic laboratory tests and complex biomarkers. Summary of a Diagnostic Summit 14–15 January 2008. www.phgfoundation.org March 2008.
44. Баранова Е.В. ДНК: знакомство с собой, или как продлить молодость. М.: АСТ, СПб.: Астрель-СПб, 2006. 222 с..
45. Brand A., Brand H., Baumen T.C. // Europ. J. Human Gene. 2008. V.16. P. 5–13.
46. Tucker T., Marta V., Friedman J.M. // Am. J. Hum.Genet. 2009. V. 85. P. 142–154.



# Акция! Один номер бесплатно

Самоорганизующиеся структуры и  
наносборки

Наноэлектроника

Устройства и изделия на  
основе наноматериалов  
и нанотехнологий

Исследования  
наноуглерода

## Подписка в редакции:

Телефон/ факс:

+7 (495) 930 88 06

E-mail: [podpiska@nanorf.ru](mailto:podpiska@nanorf.ru)

Web-site: [www.nanorf.ru](http://www.nanorf.ru)

Каталоги Роспечати (индекс 59880)  
и «Пресса России» (индекс 42368)

[www.nanorf.ru](http://www.nanorf.ru)

Российские нанотехнологии –  
ведущий\* научный журнал

\* по данным расчёта импакт-фактора за 2008 год ([elibrary.ru](http://elibrary.ru)), данные ИФ РИНЦ от 16.06.2009 г.)

УДК: 577.151.35:572.152.9:577.125.5:616.993.161

# Метаболизм D-арабинозы: характеристика бифункциональной арабинокиназы/ пирофосфорилазы *Leishmania major*

Н.М. Новожилова\*, Н.В. Бовин

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

\*E-mail: nnovogilov@gmail.com

**РЕФЕРАТ** Арабиноза входит в состав биологически важных гликоконъюгатов клеточной поверхности многих бактерий, простейших и растений. В составе природных соединений этот моносахарид находится преимущественно в виде L-арабинофуранозы, в то время как форма D-арабинопиранозы (D-Агар) встречается крайне редко. Только паразитирующие простейшие рода *Leishmania* (возбудители лейшманиоза – заболевания кожи и внутренних органов млекопитающих, в т.ч. и человека), на определенных стадиях жизненного цикла используют D-Агар в качестве важного компонента гликоконъюгатов, необходимых для их вирулентности [1]. Биосинтез D-Агар практически не изучен, и, так как этот сахар отсутствует в клетках млекопитающих, его изучение может дать ключ к созданию лекарств против лейшманиоза. Известно, что донором D-Агар в биосинтезе гликоконъюгатов *Leishmania* и *Crithidia* является GDP-D-Агар [2]. Настоящая работа направлена на изучение биосинтеза D-Агар на стадии активации моносахарида до GDP-D-Агар и характеристики необычного фермента из *L.major*, который оказался арабинокиназой-пирофосфорилазой, т.е. способен синтезировать GDP-D-Агар из D-Агар через промежуточный D-арабино-1-фосфат в присутствии АТФ и ГТФ. В данной работе также сделана попытка установить, какой из белков-переносчиков транспортирует GDP-D-Агар в люмен аппарата Гольджи, где происходит синтез арабинозосодержащих гликоконъюгатов клеточной поверхности *Leishmania*.

**Ключевые слова:** D-арабинопираноза, *Leishmania*, бифункциональный фермент, киназа, пирофосфорилаза, липофосфогликан.

**Список сокращений:** D-Агар – D-арабинопираноза; L-Фус – L-фукоза;  $K_m$  – константа Михаэлиса-Ментен;  $V_{max}$  – максимальная скорость реакции.

## ВВЕДЕНИЕ

Известно, что бактерии (род *Bacteriodes*) и растения (род *Arabidopsis*) могут синтезировать GDP-L-Fuc из L-фукозы (L-Fuc) через промежуточный L-фукозо-1-фосфат с помощью бифункционального фермента L-фукокиназы/GDP-L-фукозопирофосфорилазы [3,4]. Т.к. D-Агар и L-Fuc являются структурно родственными моносахаридами, представлялось логичным, что биосинтез GDP-D-Агар у *Leishmania* может протекать по механизмам, схожим с биосинтезом GDP-L-Fuc у других организмов. Чтобы проверить это предположение, геном *L.major* был изучен на наличие открытых рамок считывания, гомологичных участкам генов фукокиназы и GDP-L-фукозопирофосфорилазы. В результате были обнаружены два почти идентичных гена (*lmjF16.0440* и *lmjF16.0480*), обладающие высокой схожестью с генами *fkp Bacteriodes fragilis* и *at1g01220 Arabidopsis thaliana*, кодирующими L-фукокиназы/GDP-L-фукозопирофосфорилазы [3, 4].

Открытые рамки считывания *lmjF16.0440* и *lmjF16.0480* соответствуют предполагаемым полипептидам, состоящим из 1187 аминокислот, с расчетной молекулярной массой 126.5 кДа. Единственным различием (три аминокислотных остатка) между двумя белками является участок 196–199,

а именно PheGlnAsnHis для *lmjF16.0480* и LeuGlnAspGyr для *lmjF16.0440*. На N-концах этих белков находится высококонсервативный участок Val100–Lys117, который обладает высоким сходством с консервативным мотивом пирофосфорилаз, Lys(X)<sub>2</sub>GlyXThrXMet(X)<sub>4</sub>Lys [5]. На C-концах также находится консервативный участок Gly950–Pe958, гомологичный мотиву GlyXGly(X)<sub>2</sub>Gly(Ser)<sub>2</sub>Gly, формирующему АТФ-связывающий карман у многих киназ [6]. Присутствие этих консервативных последовательностей дало основание предполагать наличие киназной и пирофосфорилазной активностей на C- и N-концах белков, соответственно.

Таблица 1. Кинетические параметры сродства к субстрату рекомбинантных ферментов *lmjF16.0440* и *lmjF16.0480*

Фермент	Субстрат	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (μM/L/min)
<i>lmjF16.0440</i>	D-арабиноза	1.23	0.35
	D-арабинозо-1-фосфат	–	–
<i>lmjF16.0480</i>	D-арабиноза	2.90	0.50
	D-арабинозо-1-фосфат	67.0	160.0

**РЕЗУЛЬТАТЫ**

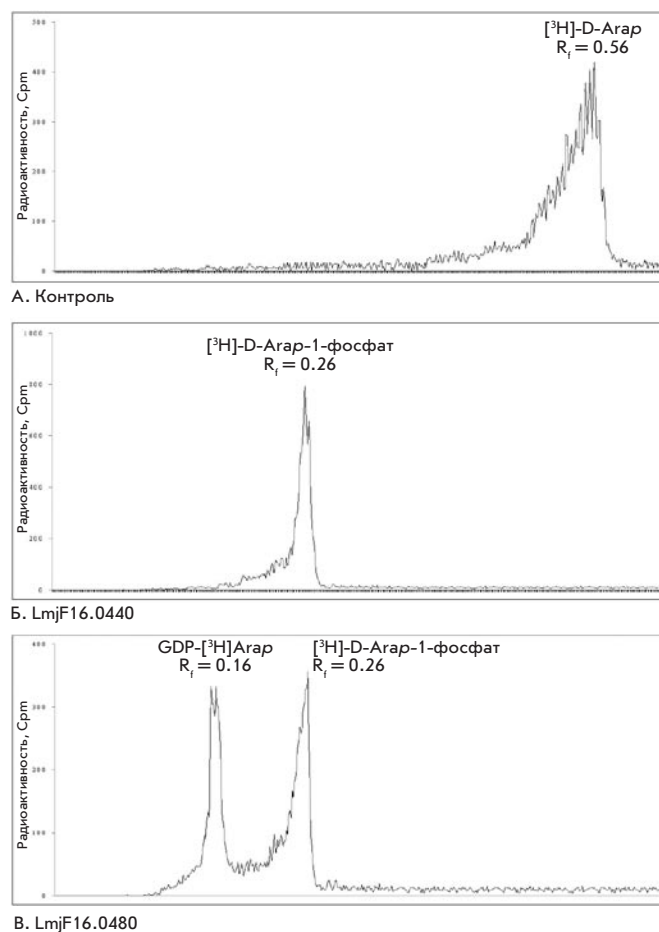
Для тестирования активности предполагаемых ферментов гены *lmjF16.0440* и *lmjF16.0480* были клонированы в плазмидный вектор pET16b. Рекомбинантные LmjF16.0440 и LmjF16.0480 были экспрессированы в клетках *E.coli* BL21 (DE3)-RIPL и протестированы на наличие ферментативной активности, результаты представлены на рис. 1. Белок LmjF16.0480 катализировал образование D-Arap-фосфата и GDP-D-Arap, в то время как LmjF16.0440 синтезировал только D-Arap-фосфат. Когда в реакционной смеси присутствовали только неспецифические белки, полученные из клеток *E.coli*, трансформированных пустым вектором pET 16b, образование продуктов реакции не наблюдалось. Полученные данные позволяют заключить, что продукт гена *lmjF16.0480* действительно действует как бифункциональная арабинокиназа-пирофосфорилаза, т.е. обладает D-арабинокиназной и GDP-D-Arap-пирофосфорилазной активностями, в то время как рекомбинантный белок LmjF16.0440 обладает только D-арабинокиназной активностью.

Чтобы подтвердить необходимость АТФ для киназной и GTP для пирофосфорилазной активностей изучаемых белков, ферментативные реакции проводили в присутствии только одного из трифосфатов. В отсутствие как АТФ, так и GTP образования продуктов реакции не наблюдалось. В присутствии только АТФ реакция шла не полностью, и приводила только к арабинозо-фосфату. Когда в реакционной смеси находился только GTP, образовывались небольшие количества GDP-D-Arap, по-видимому, благодаря тому, что фермент был способен частично утилизировать GTP вместо АТФ. Однако в присутствии только GTP реакция шла медленно, и выход продуктов реакций был низким, по сравнению с реакцией в присутствии АТФ + GTP. Таким образом, для протекания полноценной реакции необходимо присутствие в реакционной среде обоих трифосфатов: АТФ для киназной и GTP для пирофосфорилазной активности исследуемых бифункциональных ферментов.

Для рекомбинантных LmjF16.0440 и LmjF16.0480 были измерены кинетические параметры, а именно константы Михаэлиса-Ментен ( $K_m$ ) и максимальная скорость реакции ( $V_{max}$ ). В табл. 1 приведены параметры для каждой реакции с участием обоих ферментов. Как киназы, оба фермента ведут себя схожим образом. Обращает на себя внимание необычно большое значение  $K_m = 67$  мМ для пирофосфорилазной реакции, катализируемой LmjF16.0480. Такое низкое сродство к арабинозо-фосфату может свидетельствовать о том, что в ферменте оба каталитических центра связаны между собой, и D-Arap-1-фосфат из киназного центра сразу попадает в пирофосфорилазный. Поэтому, для того чтобы «внешний» арабинозо-фосфат достиг пирофосфорилазного активного центра, потребовалось добавление его значительных количеств, что и отразилось на значении  $K_m$ .

Геном человека содержит гены, обладающие частичной гомологией с бифункциональным ферментом *Leishmania*. Например, локус NP 659496 кодирует белок, состоящий из 1185 аминокислотных остатков и обладающий 44 % гомологии на киназном С-конце, однако его N-конец не имеет значимой схожести с пирофосфорилазными доменами. Ген

был клонирован, и рекомбинантный продукт гена был проверен на способность синтезировать GDP-D-Arap. Результаты тестирования показали отсутствие активности у человеческого белка. Учитывая низкую степень гомологии N-конца человеческого белка с пирофосфорилазными доменами, отсутствие у него пирофосфорилазной активности не удивительно. Способность активировать D-арабинозу также не выявлена, несмотря на большое сходство киназного С-конца с LmjF16.0440 и LmjF16.0480.



**Рис. 1.** Анализ продуктов ферментативной реакции. Штамм *E.coli* BL21 (DE3)-RIPL трансформировали плазмидами pET16b-LmjF16.0440(His)<sub>6</sub> и pET16b-LmjF16.0480(His)<sub>6</sub>, индуцированные клетки лизировали, белки солибилизовали 0.1 % Tween 20 и иммобилизовали на аффинном сорбенте TALON за счет гистидинового тэга на N-концах. Связанные с TALON рекомбинантные LmjF16.0440 и LmjF16.0480 тестировали на наличие ферментативной активности. Реакционная среда содержала 5 мМ АТФ, 5 мМ GTP, 5 мМ MgSO<sub>4</sub> и 0.15 мкCi [<sup>3</sup>H]D-Arap в качестве субстрата. Реакционную смесь инкубировали в течение ночи при 37 °С и продукты реакции разделяли на силикагельных ТСХ пластинках (1-бутанол/уксусная кислота/вода, 2 : 1 : 1). Положение тритированных продуктов реакции выявляли с помощью радиохроматографического сканера Bio Scan System 200. В контрольной смеси, содержащей только неспецифические белки, продуктов реакции не наблюдается (А). При добавлении в реакционную смесь белка LmjF16.0440 образовывался только D-Arap-фосфат (Б), в то время как фермент LmjF16.0480 синтезировал D-Arap-фосфат и GDP-D-Arap (В)

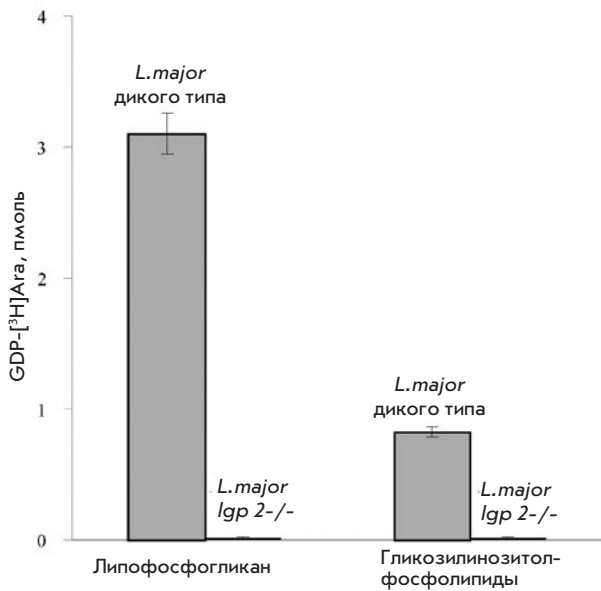


Рис. 2. Идентификация белка, ответственного за перенос GDP-D-Arap в аппарат Гольджи. Культуры *L. major* дикого типа и нокаутной по гену *lpg2* (*L. major lpg2-/-*) были метаболически мечены [<sup>3</sup>H]-D-Arap. Липофосфогликан и гликозилинозитолфосфолипиды клеточной поверхности меченых клеток были экстрагированы, как описано в [8], после чего измерено количество включенной [<sup>3</sup>H]-D-Arap. Нокаутирование гена *lpg2*, кодирующего мультиспецифичный белок-транспортёр LPG2, предотвращало включение D-Arap в состав фосфогликанов клеточной поверхности *L. major*

## ВЫВОДЫ

В большинстве случаев активированные формы углеводов синтезируются в цитоплазме и затем переносятся в люмен аппарата Гольджи, где они используются соответствующими гликозилтрансферазами как доноры субстратов в реакциях гликозилирования. Ранее было доказано существование в аппарате Гольджи *Leishmania* мультиспецифичного белка-транспортёра LPG2, способного, помимо GDP-Man, также переносить GDP-D-Arap и GDP-L-Fuc [7]. Чтобы показать, что LPG2 является единственным

транспортёром, ответственным за перенос GDP-D-Arap в аппарат Гольджи, клетки *L. major* дикого типа и нокаутные по гену *lpg2* (*L. major lpg2-/-*) растили в присутствии [<sup>3</sup>H]-арабинозы, после чего измеряли количество [<sup>3</sup>H]Ara включенной в гликоконъюгаты клеточной поверхности (рис. 2). Из приведенных данных видно, что у клеток *L. major*, нокаутных по гену *lpg2*, не происходит включения [<sup>3</sup>H]-арабинозы. Отсутствие арабинозы в липофосфогликане *L. major lpg2-/-* вполне объяснимо, т.к. потеря LPG2 приводит к прекращению транспорта GDP-Man в аппарат Гольджи и, соответственно, прекращению синтеза углеводной части молекулы [9]. Таким образом, даже при наличии GDP-Arap, транспортируемой в люмен Гольджи другим белком, у арабинозил-трансфераз нет акцепторных сайтов для переноса арабинозы на липофосфогликан. Этого нельзя сказать о гликозилинозитолфосфолипидах. Гликозилирование этих молекул происходит по другому биосинтетическому пути, с использованием долихол-фосфат-маннозы в качестве донора [10], поэтому отсутствие арабинозы в составе гликозилинозитолфосфолипидов *L. major lpg2-/-* можно объяснить прекращением транспорта GDP-Arap в аппарат Гольджи в клетках, лишенных гена *lpg2*.

Таким образом, полученные данные позволяют с высокой долей вероятности предположить, что синтезируемый в цитоплазме GDP-D-Arap транспортируется в люмен аппарата Гольджи мультифункциональным белком-переносчиком LPG2. Также установлено, что находящийся в геноме *L. major* ген *lmjF16.0480* кодирует бифункциональную арабинокиназу-пирофосфорилазу, способную синтезировать GDP-D-Arap из D-Arap через промежуточную стадию D-арабино-1-фосфата при одновременном наличии ATP и GTP.

Авторы выражают свою признательность Х. Гуо (Университет Вашингтона, США) за помощь в идентификации и клонировании генов *Leishmania major* и человека, и С. Турко (Университет Кентукки, США) за помощь в обсуждении результатов. ●

Финансирование исследований осуществлялось с помощью Программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- McConville M., Turco S., Ferguson M., Sacks D. // EMBO J. 1992. V. 11. P. 3593–3600.
- Schneider P., McConville M., Ferguson M. // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 18332–18337.
- Coyne M., Reinap B., Lee M., Comstock L. // Science. 2005. V. 307. P. 1778–1781.
- Kotake T., Hojo S., Tajima N., Matsuoka K., Koyama T. et al // JBC. 2008. V. 283. P. 8125–8135.
- Peneff C., Ferrari P., Charrier V., Taburet Y., Monnier C. et al // EMBO J. 2001. V. 20. P. 6191–6202.
- Hanks S., Quinn A., Hunter T. // Science. 1988. V. 241. P. 42–52.
- Hong K., Ma D., Beverley S., Turco S. // Biochemistry. 2000. V. 39. P. 2013–2022.
- McConville M.J., Bacic A. // JBC. 1989. V. 264. P. 757–766.
- Späth G., Lye L., Segawa H., Sacks D., Turco S. et al // Science. 2003. V. 301. P. 1241–1243.
- Ilgoutz S.C., Zawadzki J.L., Ralton J.E., McConville M.J. // EMBO J. 1999. V. 18. P. 2746–2755.

УДК 577.151.042, 577.152.27.10, 57.052.6

# Панель тирозиновых киназ как инструмент для разработки противораковых препаратов

Т. В. Ракитина<sup>1,2,\*</sup>, О. В. Юдкина<sup>3,4</sup>, Е. В. Смирнова<sup>1</sup>, А. В. Липкин<sup>3,4</sup><sup>1</sup> Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10<sup>2</sup> Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33<sup>3</sup> Институт кристаллографии им. А. В. Шубникова РАН, 119333, Москва, Ленинский просп., 59<sup>4</sup> Российский научный центр «Курчатовский институт», 123182, Москва, пл. Академика Курчатова, 1

\* E-mail: taniarakitina@yahoo.com

**РЕФЕРАТ** Одно из направлений таргетной (целевой) терапии в онкологии связано с открытием фармакологического потенциала низкомолекулярных ингибиторов онкогенных тирозиновых киназ. В настоящее время исследования, направленные на создание новых терапевтически значимых ингибиторов, невозможны без комбинации информационных и экспериментальных подходов, включая биохимический, клеточный или *in silico* скрининг и изучение трехмерной структуры активного центра киназы в комплексе с ингибитором с помощью методов кристаллизации и рентгеноструктурного анализа или молекулярного моделирования. Настоящая работа является примером сочетания экспериментального подхода к поиску ингибиторов с компьютерным анализом потенциального механизма действия активных соединений, которое позволило предложить 2-гидроксифенольную группу в качестве основы для создания новых ингибиторов тирозиновых киназ.

**Ключевые слова:** тирозиновые киназы; низкомолекулярные ингибиторы; скрининг химической коллекции; 2-гидроксифенольная группа.

## ВВЕДЕНИЕ

Открытие роли онкогенных тирозиновых киназ (ТК), получивших способность к неконтролируемой активации в результате генетических нарушений, в развитии раковых заболеваний и терапевтического потенциала их ингибирования ознаменовало новую эру в онкологии, отмеченную появлением в клинической практике таргетных, направленных на определенную белковую мишень препаратов [1]. Наиболее перспективным подходом к ингибированию онкогенных ТК считают использование низкомолекулярных химических соединений, способных конкурировать с молекулой АТФ за связывание с активным центром фермента и тем самым ингибировать киназу [2]. Первым примером успешного использования этого подхода является создание лекарственного препарата иматиниб (гливек), подавляющего активность тирозинкиназных рецепторов Kit и PDGFR, а также нерецепторной слитой тирозинкиназы Vcr-Abl [3]. Сейчас в клинической практике помимо иматиниба используют ряд препаратов аналогичного действия, но гораздо большее их число находится на разных стадиях разработки и испытаний, и параллельно идет активный поиск новых классов химических соединений, способных ингибировать тирозиновые киназы [4]. Неослабевающая активность исследователей в области разработки ингибиторов ТК связана как с уже отмеченной ролью белков этого класса в онкогенезе [2], так и со способностью мутантных форм ТК приобретать устойчивость к действию уже известных ингибиторов [5]. Кроме того, следует отметить проблему недостаточной селективности химических ингибито-

ров, действие которых направлено на АТФ-связывающие участки киназ [6], и наоборот, терапевтическую значимость одновременного ингибирования альтернативных сигнальных путей, вызывающих онкогенную трансформацию клетки [7].

Современные подходы к разработке новых терапевтически значимых ингибиторов основаны на комбинации информационных и экспериментальных методов, включая биохимический, клеточный или *in silico* скрининг и изучение трехмерной структуры активного центра киназы в комплексе с ингибитором с помощью кристаллизации и рентгеноструктурного анализа или методами молекулярного моделирования [8, 9]. Известно, что применение вычислительных методов требует информации о пространственной структуре активного центра белка-мишени или его близких аналогов, а результаты компьютерного моделирования должны быть подтверждены экспериментально. Таким образом, поиск и изучение специфичности ингибиторов требуют создания белковых панелей рекомбинантных киназных мишеней [6]. Следует отметить, что для наработки функционально активных тирозиновых киназ, как правило, используют бакуловирусную систему экспрессии [10].

Целью настоящей работы было создание панели функционально активных тирозиновых киназ и поиск ингибиторов в коллекции низкомолекулярных соединений. Анализ результатов скрининга с помощью молекулярного моделирования позволил предположить, что 2-гидроксифенольная группа является перспективной основой для создания новых ингибиторов тирозиновых киназ.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Для получения функционально активных тирозиновых киназ использовали бакуловирусную систему экспрессии Bac-to-Bac (Invitrogen, США).

Коллекция низкомолекулярных органических соединений, содержащая более десяти тысяч химических веществ с молекулярными весами от 150 до 600, для поиска ингибиторов тирозиновых киназ была предоставлена ООО «Кембридж», Москва (<http://chembridge.com/datasheets/KINASet.pdf>). Все соединения, растворенные в ДМСО до 1 мм концентрации, хранили в аликвотах на -20°C.

**Получение бакуловирусов.** Фрагменты кДНК, кодирующие 16 белков, были клонированы с помощью классического подхода: обратная транскрипция на матрице тотальной РНК, ПЦР и лигирование в T-easy вектор (Promega, США). Полный список киназ и детали клонирования представлены в табл. 1. После проверки нуклеотидных последовательностей секвенированием фрагменты кДНК были перенесены в вектор pFastBacHT-B с сохранением рамки считывания при переходе от последовательности, кодирующей шесть гистидинов, к кДНК целевого белка. Полученные конструкции pFastBacHT-TK использовали для трансформации клеток *E.coli* штамма *DH10Bac*, где плазида рекомбинировала с геномом бакуловируса. Рекомбинантные бакмиды

выделяли из клеток *E.coli* и вводили в клетки насекомых *Spodoptera frugiperda* (Sf9), культивируемые на шести-луночных планшетах при 27°C. В трансфицированных клетках происходила сборка вирусных частиц, которые вызывали лизис клеток и накапливались в ростовой среде. В процессе развития инфекции клетки синтезировали и накапливали целевые 6×Гис-TK. Все процедуры по работе с бакуловирусами проводили согласно рекомендациям к экспрессионной системе Bac-to-Bac (Invitrogen, США).

**Выделение 6×Гис-TK.** Клеточный осадок (~10<sup>9</sup> клеток или 10 г биомассы), полученный из 1 л инфицированной культуры, замораживали при -70°C, а затем лизировали в 50 мл буфера А (500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.5 и 0.1 % Triton X-100) с добавлением ДНКазы и ингибиторов протеаз. Дeterгент-нерастворимую фракцию отделяли центрифугированием (15 000 g, 1 ч, +4°C), осветленный лизат инкубировали с 2 мл Ni<sup>2+</sup> сефарозы при +4°C в течение часа. По окончании связывания смолу отмывали буфером А, содержащим 30 mM имидазол, до полного исчезновения белка в отмывке, а специфически связавшийся белок элюировали со смолы буфером А, содержащим 350 mM имидазол. Выделенные 6×Гис-TK переводили из элюирующего буфера в буфер, содержащий 50 mM Tris-HCl pH 8.5, 100 mM NaCl, 0.05 % Triton X-100, путем обессоливания

Таблица 1. Детали создания панели тирозиновых киназ

Тирозиновые киназы	Acc. N AA	Прямой и обратный праймеры <sup>1</sup> (5'-3')
Abl – Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1	NP_005148 2-601	GGATCCTTGGAGATCTGCCTGAAGCTG ACTCGAGCCGAACAAGTTGGTCTTTTG
Alk – Anaplastic Lymphoma Kinase Receptor	NP_004295 1092-1406	CATGGATCCTTACAACCCCACTAC GCTCGAGTTTATCCACAAGTGGACCAT
Blk – B-Lymphocyte Kinase	NP_001706 2-505	GGATCCGGGCTGGTAAGTAGCA CTCGAGGGCTGCAGCTCGTACTG
CSF1R – Colony Stimulating Factor 1 Receptor	NP_005202 545-972	GGATCCAAGTACCAGGTCCGCT CTCGAGCAGAACTGATAGTTGTTG
Csk – C-Terminal c-Src Kinase	NP_004374 2-450	TGGATCCTCAGCAATACAGCGCC ACTCGAGAGGTGCAGCTCGTGGGTT
Eph A2 – Ephrin Receptor A2	NP_004422 562-976	AGATCTAGGAGGAAGAACCAGC CTCGAGATGGGGATCCCCACAG
FGFR1 – Fibroblast Growth Factor Receptor 1	NP_056934 398-820	GGATCCAAGAGTGGTACCAAGAAGAGT TTCTCGAGCGGCGTTTGGAGTCCGCCATT
FGFR2 – Fibroblast Growth Factor Receptor 2	NP_075259 402-822	GGATCCAAGAACACGACCAAGAAGC CTCGAGGTTTAAACACTGCCGTTTATG
IGFR1 – Insulin-like Growth Factor 1 Receptor	NP_000866 974-1294	GGATCCAGAAAGAGAAATAACAGCAGG GCTCGAGTTAATCCAGTCTCTCCGGCTC
InsR – Insulin Receptor	NP_000199 982-1382	GGATCCAGGCAGCCAGATGGGCCGCTG CTCGAGGAAGGATTTGGACCGAGGCAAG
Kit – Stem Cell Factor Receptor	NP_000213 545-976	TGGATCCTACAAATATTTACAGAAACCC TTCTCGAGACATCGTCTGTGCACAAGCAG
Lyn – Yamaguchi Sarcoma Viral Related Oncogene Homolog 2	NP_002341 полноразм.	GGGATCCGGATGTATAAAATCAAAGG GGAATTCTCGAGGGCTGCTGCTGGTATT
PDGFRa – Platelet-Derived Growth Factor Receptor-α	NP_006197 552-1089	GGATCCAAGCCAGTTCAGGATCCGAT GTCGACAGGAAGCTATCCTGTCTCCG
Pyk2 – Focal Adhesion Kinase 2	NP_004094 353-762	TGGATCCCGGCTGCAGGGTGAGACCA TTCTCGAGTTAACGGGAGATGGATACTC
Syk – Spleen Tyrosine Kinase	NP_003168 полноразм.	GGATCCGCCAGCAGCGGCATGGCTGAC CTCGAGTTCACCACCTCATAGTAGTA
Yes – Yamaguchi Sarcoma Viral Oncogene Homolog 1	NP_005424 11-542	CGGGATCCCCAGCCATTAATAACAGAC TCGTCGACAAATTTCTCTGGCTGGTA

<sup>1</sup> – Выделены сайты рестрикции, используемые для переклонирования из T-easy вектора в pFastBacHT-B.

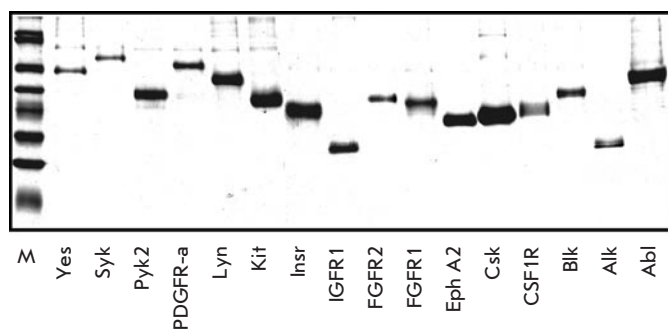


Рис. 1. Анализ очищенных препаратов рекомбинантных 6xHis-ТК. Электрофореграмма разделения белков в 10 % ДСН-ПААГ с последующим окрашиванием Кумасси G-250. Слева маркер молекулярных масс (116, 97, 66, 55, 45, 36, 29, 24 кДа), далее – нанесены 10 мкл аликвоты 6xHis-ТК

на колонке PD-10 и после добавления ДТТ до 2 мМ и глицерина до 50 % помещали на -20°C.

**Определение активности 6xHis-ТК.** В каждую киназную реакцию вносили АТФ до 10 мкМ концентрации, универсальный субстрат тирозиновых киназ poly(Glu<sub>4</sub>-Tyr) (Sigma, США) до 10 мкг и одну из 6xHis-ТК в количестве 30, 60 или 90 нг в 1xкиназном буфере: 50 мМ Tris-HCl, pH 7.5, 5 мМ MnCl<sub>2</sub>, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.01 % Tween-20 и 2 мМ DTT. Для контроля исходного уровня АТФ реакции проводили в отсутствие киназы. Киназные реакции проводили в объеме 30 мкл в ячейках 384-луночных планшетов, при 30°C, в течение 15 мин и проявляли путем добавления 10 мкл реагента Kinase-Glo (Promega, США). Люминесценцию детектировали с помощью Fusion Universal Microplate Analyzer (PerkinElmer, США). Для определения активности 6xHis-ТК проводили два эксперимента в трипликатах.

**Проведение скрининга коллекции низкомолекулярных соединений.** Скрининг проводили путем определения способности химических соединений снижать активность тирозиновых киназ, измеряемую в люминесцентном киназном тесте. Все необходимые разведения компонентов киназных реакций готовили в 1xкиназном буфере непосредственно перед началом скрининга. Реакции проводили в лунках 384-луночного планшета, в трипликатах, вручную или при помощи MultiPROBE II (Packard, США). В каждый планшет включали контрольные ячейки, содержащие АТФ с киназой без ингибиторов (0 % ингибирования) и АТФ без киназы (100 % ингибирования). Киназные реакции собирали и проводили в следующем порядке: 1) в лунки добавляли 10 мкл 30 мкМ потенциального ингибитора или 3 % ДМСО, 2) добавляли 10 мкл 1xкиназного буфера с требуемым количеством киназы, 3) инкубировали 20 мин при 20°C, 4) добавляли 10 мкл 30 мкМ АТФ с 10 мкг poly(Glu<sub>4</sub>-Tyr), 5) инкубировали 90 мин при 30°C, 6) добавляли 10 мкл реагента Kinase-Glo и измеряли люминесценцию.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

С целью создания панели тирозиновых киназ для проведения скрининга химической коллекции были выбраны 16 белков, принадлежащих к пяти семействам рецепторных ТК и пяти семействам нерецепторных ТК (табл. 1). Для ре-

цепторных и некоторых цитоплазматических ТК вместо полноразмерных белков были использованы фрагменты, содержащие киназные домены, которые представляют собой функциональную модель для поиска и изучения АТФ конкурентных ингибиторов [11]. Для экспрессии рекомбинантных белков была выбрана бакуловирусная система, считающаяся оптимальной для получения функционально-активных тирозиновых киназ [10]. В N-концевые области рекомбинантных белков были введены последовательности из 6 гистидиновых остатков, что позволяло выделять все шестнадцать 6xHis-ТК в одну стадию с помощью металлохелатной аффинной хроматографии на Ni<sup>2+</sup>-сефарозе, которую проводили, основываясь на методических рекомендациях, разработанных для данного типа хроматографии, и результатах аналитических экспериментов по оптимизации условий выделения белков. Финальный протокол выделения приведен в разделе «Материалы и методы».

Выделенные белки анализировали с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ в денатурирующих условиях с последующим окрашиванием Кумасси G-250 (рис. 1). Все 6xHis-ТК обладали электрофоретическими подвижностями, соответствующими расчетным молекулярным весам, и имели чистоту не менее 70 % (табл. 2). Все 16 продуктов экспрессии были однозначно подтверждены с помощью

Таблица 2. Характеристики 6xHis-ТК после стандартного эксперимента по наработке и выделению

6xHis-ТК	Мол. вес <sup>1</sup> (кДа)	Чистота <sup>2</sup> (%)	Выход <sup>3</sup> (мг)	Уд. акт. <sup>4</sup> (нмоль/мин · мг)	Количество на 1 тест <sup>5</sup> , нг/тест
Abl	72.5	85	6	118	50
Alk	38.8	75	1	60	90
Blk	63.8	80	3.5	91	60
CSF1R	54.0	80	5	98	60
Csk	56.7	90	20	153	40
Eph A2	53.4	95	10	110	50
FGFR1	52.5	70	1.5	223	20
FGFR2	53.8	70	1.5	245	20
IGFR1	39.8	80	2	147	40
Insr	51.4	85	6.5	131	40
Kit	55.0	75	3	80	70
Lyn	63.4	75	1.5	332	20
PDGFR-a	67.4	70	2.5	84	70
Pyk2	52.0	80	3.5	86	70
Syk	78	70	1.9	131	50
Yes	65.7	70	1.5	273	20

<sup>1</sup> – Расчетный молекулярный вес рекомбинантных 6xHis-ТК.  
<sup>2</sup> – Чистоту белка определяли с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ с последующим окрашиванием Кумасси G-250.  
<sup>3</sup> – Выход 6xHis-ТК из 1 литра (10 г) клеток определяли исходя из концентрации белка, определенной по методу Бредфорд.  
<sup>4</sup> – Удельные активности определяли при концентрации фермента 1.5 мкг/мл (45 нг/тест, рис. 2).  
<sup>5</sup> – Количество 6xHis-ТК, гидролизующее за 90 мин инкубации не более 80 % исходного количества АТФ, рассчитывали исходя из удельных активностей и проверяли экспериментально.

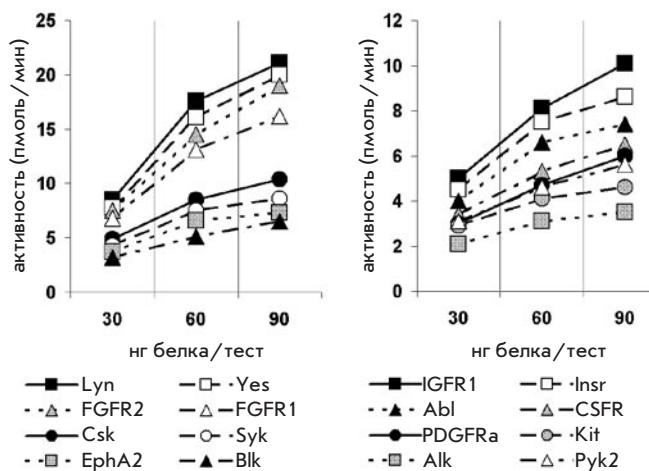


Рис. 2. Активность 6xГис-ТК. Активность киназ, измеренная в люминесцентном киназном тесте, выражена в пикомолях фосфата, перенесенного с молекул АТФ на субстрат poly(Gly<sub>4</sub>-Tyr) указанным количеством киназы за 1 мин. Представлены средние значения, полученные в результате двух экспериментов, проводимых в трипликатах

MALDI-TOF-масс-спектрометрии. Концентрацию очищенных 6xГис-ТК определяли по методу Бредфорд, выходы рекомбинантных белков составляли от 1 до 20 мг белка на литр инфицированных клеток (табл. 2).

Для определения активности выделенных киназ был выбран метод, основанный на прямом одностадийном измерении количества АТФ в киназной реакции с помощью люминесцентного реагента Kinase-Glo, хорошо сочетающийся с процедурой проведения высокопроизводительного скрининга [12]. Уровень люминесценции, измеренный в киназной реакции или контроле, переводили в молярность АТФ, используя стандартную кривую титрования, после чего определяли количество АТФ, гидролизованное

каждой киназой за 1 мин, и строили графики зависимости уровня киназной активности от количества фермента в реакционной смеси (рис. 2). Удельную активность определяли при концентрации фермента 1.5 мкг/мл (45 нг в реакции) и выражали в нмоль фосфата, перенесенного от молекулы АТФ на субстрат за 1 мин в пересчете на 1 мг киназы при стандартных условиях реакции. Удельная активность для 6xГис-ТК, а также рассчитанные на ее основе количества ферментов, добавляемые в киназные реакции при проведении скрининга химической коллекции, приведены в табл. 2.

Протокол проведения скрининга коллекции низкомолекулярных соединений приведен в разделе «Материалы и методы». Потенциальные ингибиторы тестировали против каждой из 16 киназ в одной рабочей концентрации (10 мкМ). При разработке протокола скрининга учитывали то, что люминесцентный реагент Kinase-Glo обеспечивает линейную зависимость между количеством АТФ в реакции и интенсивностью люминесцентного сигнала в диапазоне концентраций АТФ от 1 до 100 мкМ. Исходя из начальной концентрации АТФ 10 мкМ количество добавляемой киназы подбирали так, чтобы по окончании инкубации в реакционной смеси оставалось не менее 20 % негидролизованного АТФ. Выбор проводили на основании удельной активности ТК и проверяли в аналитическом эксперименте. После проведения киназных реакций и измерения люминесценции относительные люциферазные единицы нормализовали на контрольные реакции и переводили в % ингибирования. Достоверность результатов скрининга подтверждали вычислением Z' фактора для каждого планшета, используя метод Zhang et al. [13]. Z' фактор для большинства планшетов составлял более 0.5, а среднее значение Z' фактора для всего скрининга было 0.59 ± 0.1. Соединения, в 10 мкМ концентрации ингибирующие активность хотя бы одной из 16 6xГис-ТК на 50 % и более, отбирали для последующей проверки, проводимой в двух независимых экспериментах.

В результате проведенного скрининга были найдены шесть химических соединений, активных в отношении ТК,

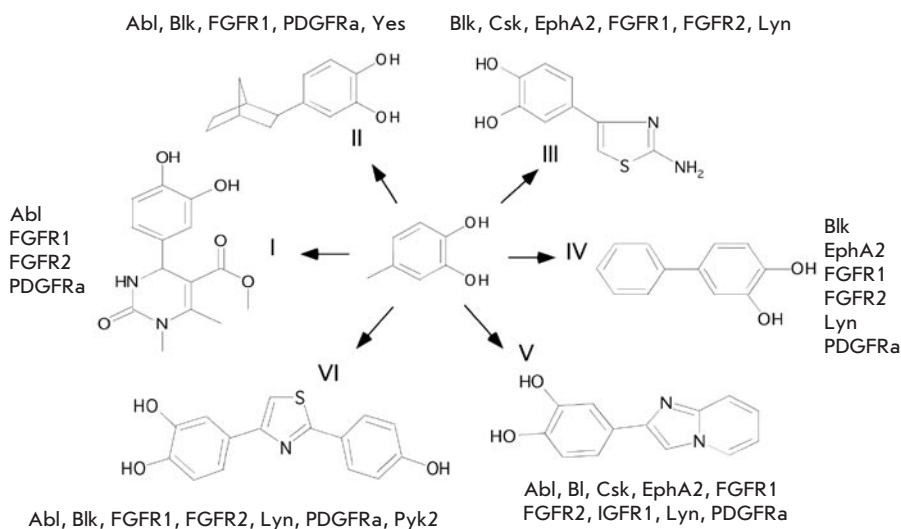


Рис. 3. Ингибиторы тирозинных киназ, найденные при скрининге химической коллекции. В центре 2-гидроксифенольная группа, общая для всех 6 ингибиторов. Около каждого ингибитора указаны ТК, активность которых данное соединение в 10 мкМ концентрации подавляет на 50 % и более



содержащие в своем составе 2-гидроксифенольную группу (рис. 3). Поиск по базам данных Chemical Abstracts Service (<http://www.cas.org/expertise/cascontent/registry/index.html>) и PubChem BioAssay (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pcassay>) выявил, что ни одно из найденных соединений не относится к числу известных ингибиторов тирозиновых киназ. Данные соединения одновременно ингибировали от четырех до девяти ТК. Наиболее частыми мишенями ингибирования были FGFR1, Abl, Blk, FGFR2, PDGFR- $\alpha$ , а также Lyn, Eph A2, Csk и в единичных случаях IGFR1, Puck2, Yes. Так как все соединения содержали в своем составе 2-гидроксифенольную группу, мы предположили, что именно она отвечает за способности ингибиторов взаимодействовать с киназными доменами. Известно, что классические киназные ингибиторы имеют фармакофор (минимальную молекулярную основу, определяющую биологическую активность), в котором соседние ароматическая аминогруппа и ароматический азот или кислород карбонильной группы образуют пару координированных водородных связей с шарнирной областью киназного домена (АТФ-связывающий участок), имитируя водородные связи молекулы АТФ [14]. Молекулярный докинг ингибиторов I–VI, проведенный на основе известных пространственных структур киназных доменов Csk, FGFR1, FGFR2 с помощью программы Lead Finder [15], показал, что 2-гидроксифенольная группа тоже способна сформировать пару водородных связей с аминокислотами АТФ-связывающего участка и, следовательно, может быть рассмотрена в качестве нового фармакофора тирозинкиназных ингибиторов. Поиск аналогичного взаимодействия в базе данных Protein Data Bank (<http://www.pdb.org/>) выявил, что аналогичные водородные связи формируются в комплексах, образуемых фосфоинозитид-3-киназой (PI3-kinase) с флавоноидами кверцитином и мирицетином [16]. Следует отметить, что молекулярный вес соединений

I–VI значительно ниже, чем у всех известных ингибиторов ТК, что, вероятно, и объясняет их способность проникать в АТФ-связывающие карманы различных киназ. В то же время именно низкий молекулярный вес соединений обеспечивает возможность их дальнейшего модифицирования или комбинирования с фрагментами уже известных ингибиторов ТК с целью увеличения специфичности и эффективности в отношении выбранной мишени. В дальнейшем мы планируем подтвердить результаты моделирования в экспериментах по кристаллизации ТК с найденными ингибиторами.

## ВЫВОДЫ

В результате проделанной работы была создана белковая панель функционально активных тирозиновых киназ и проведен скрининг коллекции низкомолекулярных органических соединений, в результате которого были отобраны шесть ранее неизвестных ингибиторов, содержащих в своем составе 2-гидроксифенольную группу. Молекулярный докинг активных соединений с помощью программы Lead Finder показал, что 2-гидроксифенольная группа может быть предложена в качестве основы для создания новых ингибиторов тирозиновых киназ. ●

*Данная работа поддержана Федеральным агентством по науке и инновациям (ГК 02.512.12.2051)*

*и программой Президиума Российской академии наук «Молекулярная и клеточная биология».*

*Авторы выражают признательность ООО «Кембридж», Москва за предоставление химической коллекции, Р.Х. Зиганшину (лаборатория протеомики ИБХ РАН) за проведение MALDI-TOF-масс-спектрометрии и MolTech Ltd, Москва за проведение молекулярного моделирования.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Cohen P. // Nat. Rev. Drug Discov. 2002. V. 1. P. 309–315.
- Gunby R.H., Sala E., Tartari C.J., Puttini M., Gambacorti-Passerini C., Mologni L. // Anti-Cancer Agents in Med. Chem. 2007. V. 7. P. 594–611.
- Cohen M.H., Johnson J.R., Pazdur R. // Clin. Cancer Res. 2005. V. 11 (1). P. 12–9.
- Jianming Z., Priscilla L., Gray N.S. // Nat. Rev. Cancer. 2009. V. 9. P. 28–39.
- Hofmann W.-K., Jones L.C., Lemp N.A., de Vos S., Gschaidmeier H., Hoelzer D., Ottmann O.G., Koeffler H.P. // Blood. 2002. V. 99. P. 1860–1862.
- Bain J., Plater L., Elliott M., Shpiro N., Hastie J., McLauchlan H., Klevernic I., Arthur S.C., Alessi D., Cohen P. // Biochem. J. 2007. V. 408. P. 297–315.
- Faivre S., Djellou S., Raymond E. // Semin. Oncol. 2006. V. 33 (4). P. 407–420.
- Drews J. // Science. 2000. V. 287. P. 1960–1964.
- Anderson A. // Chem. & Biol. 2003. V. 10. P. 787–797.
- Chambers S.P., Austen D.A., Fulghum J.R., Kim W.M. // Protein Expr. Purif. 2004. V. 36. P. 40–47.
- Mologni L., Sala E., Riva B., Cesaro L., Cazzaniga S., Redaelli S., Marin O., Pasquato N., Donella-Deana A., Gambacorti-Passerini C. // Protein Expr. Purif. 2005. V. 41. P. 177–185.
- Koresawa M., Okabe T. // Assay and Drug Dev. Technol. 2004. V. 2. P. 153–160.
- Zhang J.H., Chung T.D., Oldenburg K.R. // J. Biomol. Screen. 1999. V. 4. P. 67–73.
- Fabbro D., Ruetz S., Buchdunger E., Cowan-Jacob S.W., Fendrich G., Liebetanz J., Mestan J., O'Reilly T., Traxler P., Chaudhuri B., Fretz H., Zimmermann J., Meyer T., Caravatti G., Furet P., Manley P.W. // Pharmacol Ther. 2002. V. 93 (2–3). P. 79–98.
- Stroganov O.V., Novikov F.N., Stroylov V.S., Kulkov V., Chilov G.G. // J. Chem. Inf. Model. 2008. V. 48. P. 2371–2385.
- Walker E.H., Pacold M.E., Perisic O., Stephens L., Hawkins P.T., Whyman M.P., Williams R.L. // Mol. Cell. 2000. V. 6. P. 909–919.

УДК 577.322.63

# Пространственная структура НАД<sup>+</sup>-зависимой формиатдегидрогеназы из бактерий *Moraxella* sp. C-1 при атомном разрешении

И.Г. Шабалин<sup>1</sup>, К.М. Поляков<sup>2,1</sup>, В.И. Тишков<sup>1</sup>, В.О. Попов<sup>1\*</sup><sup>1</sup> Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33<sup>2</sup> Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

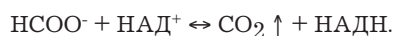
\*E-mail: vpopov@inbi.ras.ru

**РЕФЕРАТ** Решена с разрешением 1.1 Å кристаллическая структура тройного комплекса НАД<sup>+</sup>-зависимой формиатдегидрогеназы из мезофильной бактерии *Moraxella* sp. C-1 с кофактором (НАД<sup>+</sup>) и ингибитором (ионом азиды), имитирующая структуру переходного состояния ферментативной реакции. Структура уточнена с учетом анизотропии тепловых колебаний неводородных атомов до R-фактора 13.4 %. На основании анализа значений температурных факторов и пиков электронной плотности удалось различить большинство атомов азота, кислорода и углерода, что дало возможность однозначно установить поворотные изомеры боковых цепей остатков гистидина и большинства остатков аспарагина и глутамина. Проведен сравнительный анализ структур тройного комплекса с атомным разрешением и с разрешением 1.95 Å. В структуре атомного разрешения обнаружена тенденция к изменению длин ковалентных связей никотинамидной группы кофактора, согласующаяся с данными квантовомеханических расчетов, указывающими на приобретение кофактором характера биполярной формы в переходном состоянии ферментативной реакции.

**Ключевые слова:** формиатдегидрогеназа, рентгеноструктурный анализ, атомное разрешение, ферментативный катализ.

## ВВЕДЕНИЕ

Формиатдегидрогеназы катализируют реакцию окисления иона формиата до углекислого газа и представляют собой несколько групп ферментов, отличающихся как по четвертичной структуре, так и по наличию простетических групп и кофакторов. Среди формиатдегидрогеназ наиболее простыми по строению ферментами являются НАД<sup>+</sup>-зависимые формиатдегидрогеназы (ФДГ, КФ 1.2.1.2), которые окисляют ионы формиата при сопутствующем восстановлении кофермента НАД<sup>+</sup> до НАДН [1]:



ФДГ принадлежат к большому суперсемейству D-специфичных дегидрогеназ 2-оксикислот [2]. Формиатдегидрогеназы данного типа не содержат в активном центре ионов металлов или простетических групп и обладают высокой специфичностью как к НАД<sup>+</sup>, так и к иону формиата. ФДГ из различных организмов (бактерии, дрожжи, растения) функционируют в виде димера, состоящего из двух идентичных субъединиц, имеющих массу от 35 до 50 кДа. Особенностью молекулярного механизма действия ФДГ является прямой перенос гидрид-иона от субстрата на атом С4 никотинамидного кольца НАД<sup>+</sup> без дополнительных стадий переноса протона, присутствующих в реакциях, катализируемых другими родственными НАД<sup>+</sup>-зависимыми

дегидрогеназами. Поэтому реакция, катализируемая ФДГ, является удобной моделью для изучения механизма переноса гидрид-иона в активном центре НАД<sup>+</sup>-зависимых дегидрогеназ методами квантовой механики и молекулярной динамики [3–5].

Для изучения молекулярного механизма действия большое значение имеют данные по пространственной структуре исследуемого фермента с высокой точностью определения координат индивидуальных атомов. Дифракционные данные с атомным разрешением дают возможность уточнить структуру белка с учетом анизотропии тепловых колебаний отдельных неводородных атомов, что значительно повышает достоверность структурной информации и позволяет определять координаты атомов с точностью порядка 0.02 Å [6]. При этом проявляются тонкие особенности структурной организации активного центра, которые не могут быть выяснены при более низком разрешении.

В настоящее время в базе данных белковых структур (PDB, <http://www.rcsb.org>) депонировано 937 структур белков с атомным разрешением, что составляет около 1.6 % общего числа структур. Структуры с атомным разрешением были решены только для трех представителей НАД<sup>+</sup>-зависимых дегидрогеназ – алкогольдегидрогеназы из печени лошади (5 структур) [7–9], R-специфичной алкогольдегидрогеназы из *Lactobacillus brevis* (3 структуры) [10] и лактатдегидрогеназы из *Plasmodium falciparum* (1

структура) [11]. Имеющиеся пространственные структуры ФДГ были решены с разрешением не выше 1.8 Å для холо-формы [12] и 1.55 Å для апо-формы [13]. В данной работе решена с атомным разрешением (1.1 Å) пространственная структура тройного комплекса формиатдегидрогеназы из метилотрофной бактерии *Moraxella* sp. C-1 (MorФДГ) с кофактором (НАД<sup>+</sup>) и ингибитором (ионом азида), имитирующая структуру переходного состояния ферментативной реакции.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Кристаллы тройного комплекса MorФДГ-НАД<sup>+</sup>-азид были выращены методом диффузии растворителя через газовую фазу в висячих каплях. Рекомбинантная полноразмерная MorФДГ была экспрессирована и очищена по методике, описанной в [14]. Чистота фермента составила не мене 97 % согласно электрофоретическому анализу в ПААГ. Для кристаллизации использовали раствор MorФДГ с концентрацией 10.5 мг/мл в 0.1 М калий-фосфатном буфере с pH 7.0, содержащем 5 мМ НАД<sup>+</sup> и 5 мМ азида натрия. Противораствор состоял из 0.1 М Bis-Tris буфера с pH 6.5 и 2.0 М сульфата аммония. Висячие капли объемом 4 мкл готовили смешиванием равных частей раствора белка и противораствора на силиконированном стекле. Стекло с каплей кристаллизационного раствора герметически закрывали ячейку пластикового планшета Linbro фирмы Hampton Research, в которую предварительно помещали 500 мкл противораствора. Планшеты хранили в термостатируемом шкафу при температуре 20 °С. Кристаллы росли в течение двух месяцев. Средние размеры кристаллов составили 0.6 × 0.3 × 0.2 мм (рис. 1).

Дифракционные данные были собраны на длине волны 0.8166 Å с использованием CCD детектора MAR165 на станции X11 накопительного кольца DORIS синхротрона DESY

филиала лаборатории EMBL в Гамбурге. Для уменьшения радиационного разрушения кристалла и повышения разрешения за счет уменьшения амплитуд тепловых колебаний атомов кристалл в процессе сбора данных охлаждался азотом при температуре 100 К на криоустановке CryoJet. Перед замораживанием в струе азота кристалл был помещен на 30 с в криораствор, содержащий 0.1 М Bis-Tris буфер с pH 6.5, 2.3 М сульфат аммония и 30 % (по объему) глицерина. Были собраны два набора дифракционных данных с одного кристалла: первый набор с разрешением 20-1.5 Å с малым временем экспозиции и второй набор с разрешением 20-1.1 Å с большим временем экспозиции. Это позволило избежать потери рефлексов низкого разрешения, интенсивности которых при больших временах экспозиции оказываются переэкспонированными, и измерить с достаточной точностью интенсивности слабых отражений высокого разрешения. Данные обрабатывались программами DENZO и SCALEPACK [15]. Кристаллы принадлежали к пространственной группе C2 с параметрами элементарной ячейки:  $a = 79.2 \text{ \AA}$ ,  $b = 66.2 \text{ \AA}$ ,  $c = 74.2 \text{ \AA}$ ,  $\beta = 103.4$  град.

Кристаллы оказались изоморфны кристаллам, использованным для решения структуры тройного комплекса MorФДГ-НАД<sup>+</sup>-азид с разрешением 1.95 Å [14], что позволило использовать в качестве исходной модели уточненную ранее структуру. Кристаллографическое уточнение проводили по программе REFMAC [16]. При уточнении учитывался вклад в рассеивание атомов водорода, координаты которых рассчитывались исходя из стандартной стереохимии аминокислотных остатков и координат соответствующих ковалентно-связанных атомов при каждом цикле уточнения. Для всех неводородных атомов температурные факторы уточнялись в анизотропном приближении. Для визуального контроля за ходом уточнения, внесения изменений в атомную модель структуры и локализации молекул воды использовалась графическая программа COOT [17]. Вносимая корректировка основывалась на анализе разностных синтезов Фурье с коэффициентами  $(2|F_o| - |F_c|)$  и  $(|F_o| - |F_c|)$ , где  $|F_o|$  и  $|F_c|$  – экспериментальные и рассчитанные модули структурных факторов. Качество белковой модели анализировалось программой PROCHECK [18]. Ошибки координат атомов рассчитывались программой SFHECK [19]. Статистические характеристики набора дифракционных данных и атомной модели приведены в табл. 1.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Значительным преимуществом атомного разрешения является большое количество дифракционных данных относительно количества уточняемых параметров, что позволяет уточнять температурные факторы неводородных атомов в анизотропном приближении. В изотропном приближении уточняются только три позиционных параметра и изотропный температурный фактор для каждого неводородного атома. Для уточнения в анизотропном приближении вместо одного параметра изотропного температурного фактора необходимо ввести шесть параметров анизотропного температурного фактора – три параметра для ориентации и три параметра для размера главных осей эллипсоида. Такой подход позволяет значительно точнее интерпретировать дифракционные данные. Включение параметров анизотро-

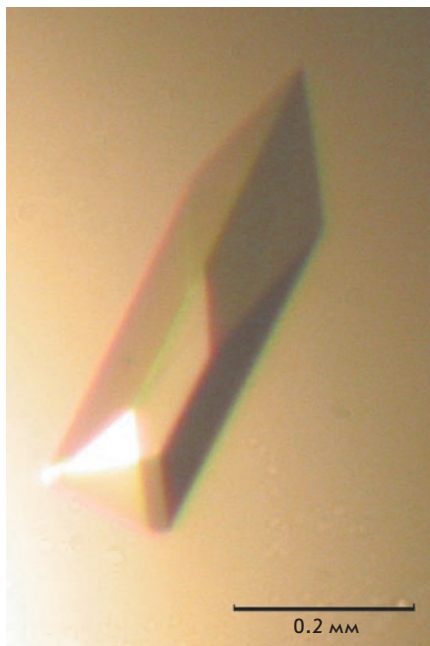


Рис. 1. Фотография кристаллов тройного комплекса MorФДГ-НАД<sup>+</sup>-азид

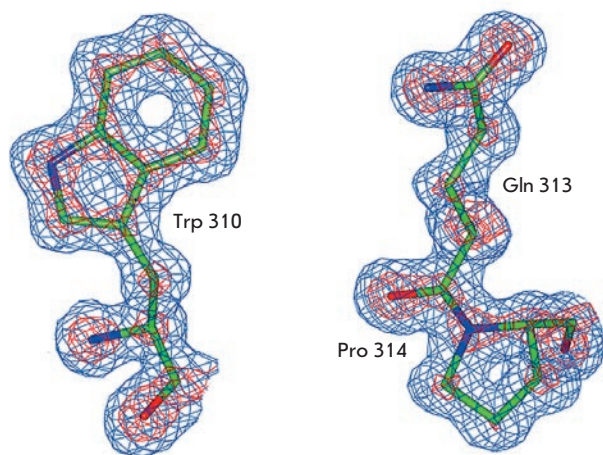


Рис. 2. Карта электронной плотности с коэффициентами  $2|F_o| - |F_c|$  для остатков Trp310, Gln313 и Pro314. Уровень срезки 1  $\sigma$  (синяя) и 3.5  $\sigma$  (красная)

пии в кристаллографическое уточнение структуры комплекса МорФДГ-НАД<sup>+</sup>-азид снизило R-фактор на 5.3 %, а R<sub>free</sub> – на 5.2 %. При этом средневзвешенная ошибка координат атомов (DPI) уменьшилась от 0.036 до 0.028 Å. В ранее опубликованной структуре комплекса МорФДГ-НАД<sup>+</sup>-азид с разрешением 1.95 Å эта величина составляет 0.141 Å [14]. Высокое качество электронной плотности структуры с атомным разрешением иллюстрировано на рис. 2.

Ход полипептидной цепи решенной структуры тройного комплекса МорФДГ-НАД<sup>+</sup>-азид представлен на рис. 3. В независимой части элементарной ячейки находится одна субъединица фермента. Молекулу МорФДГ образуют две субъединицы, связанные кристаллографической поворотной осью симметрии второго порядка (рис. 3). В структуре были локализованы 399 аминокислотных остатков, 437 молекул воды, одна молекула НАД<sup>+</sup>, четыре иона азиды и шесть молекул глицерина. При этом молекула НАД<sup>+</sup> и один ион азиды связаны в активном центре фермента, в то время как три иона азиды и все молекулы глицерина локализованы на поверхности белковой глобулы. Как и в структуре с разрешением 1.95 Å, на С-конце полипептидной цепи фермента были локализованы восемь остатков (392–399), которые не удавалось локализовать по картам электронной плотности в ранее решенной структуре холо-формы ФДГ из бактерии *Pseudomonas sp. 101* [12]. Тем не менее последние два аминокислотных остатка локализовать не удалось, что скорее всего связано с разупорядоченностью этих остатков.

Среднеквадратичное отклонение по координатам всех Са атомов структур МорФДГ-НАД<sup>+</sup>-азид, решенных при разрешениях 1.1 Å и 1.95 Å, равно 0.30 Å, что свидетельствует об их идентичности. При этом максимальное отклонение составляет 1.1 Å (остаток Ser18). Координаты атомов боковых цепей 18 остатков, локализованных на поверхности белковой глобулы, отличаются более чем на 1 Å, причем максимальное отличие составляет 9 Å (остаток Arg26). Эти различия могут быть вызваны как свойствами

Таблица 1. Статистические характеристики набора дифракционных данных и атомной модели. В скобках приведены значения для последнего слоя разрешения (1.11 – 1.10 Å)

Разрешение, Å	20 – 1.1
Число измеренных рефлексов	586345 (9155)
Число независимых рефлексов	145564 (3662)
Мозаичность, град	0.7
Повторяемость	4.0 (2.5)
Полнота набора, %	96.5 (73.8)
R <sub>merge</sub> , %	5.1 (52.9)
<I>/<σ(I)>	44 (1.9)
Температурный фактор из графика Вильсона, Å <sup>2</sup>	11.5
R-фактор/R <sub>free</sub> , %	13.4/15.9
Среднеквадратичное отклонение длин валентных связей, Å	0.015
Среднеквадратичное отклонение валентных углов, град	1.7
Минимальная ошибка в координатах атомов, Å	0.014
Средневзвешенная ошибка координат атомов (DPI), Å	0.028
Число неводородных атомов в модели:	
белок	3106
вода	437
лиганды	84
Средний температурный фактор, Å <sup>2</sup> :	
всех атомов	20.7
атомов основной цепи	18.1
атомов боковых цепей	20.1
молекул воды	31.8
атомов лигандов	24.9
Число остатков на графике Рамачандрана*:	
в наиболее благоприятных областях	306
в разрешенных областях	33
в запрещенных областях	1 <sup>o</sup>

\* За исключением остатков Gly и Pro.

<sup>o</sup> Ala198 в структуре ФДГ находится в недопустимой конформации на графике Рамачандрана. Исчерпывающее объяснение необычности конформации этого остатка приведено в [12].

самих кристаллов, выращенных в несколько различных кристаллизационных условиях, так и ошибочным моделированием боковых цепей в структуре с более низким разрешением.

Значительным отличием структуры с атомным разрешением является количество локализованных молекул воды, которых в 2.4 раза больше, чем в структуре с разрешением 1.95 Å (437 и 181 соответственно). При этом 169 молекул воды имеют практически одинаковые позиции в обеих структурах. Фактически, в структуре с разрешением 1.95 Å были локализованы консервативные, высокоупорядоченные молекулы воды, находящиеся внутри полостей белковой глобулы и в первом слое растворителя. Структура с атомным разрешением позволила гораздо более четко и достоверно определить структуру растворителя в кристалле комплекса МорФДГ-НАД<sup>+</sup>-азид.

Благодаря высокой точности дифракционных данных атомное разрешение позволяет более точно идентифицировать альтернативные конформации остатков. В структуре МорФДГ-НАД<sup>+</sup>-азид с разрешением 1.95 Å лишь пять остатков имели две различные конформации. Значительное улучшение качества электронной плотности в структуре с атомным разрешением позволило идентифицировать 10

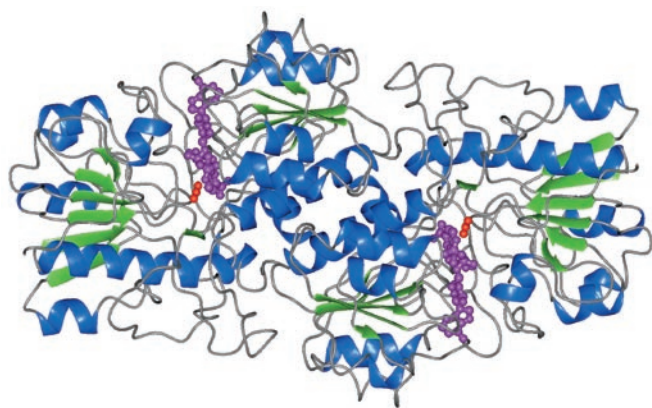


Рис. 3. Ход полипептидной цепи тройного комплекса МоФДГ-НАД<sup>+</sup>-азид. Поворотная ось симметрии 2-го порядка, связывающая субъединицы в димере, направлена перпендикулярно плоскости рисунка. Молекула НАД<sup>+</sup> показана фиолетовым цветом, ион азиды показан красным цветом

таких остатков. Боковые цепи пяти остатков лизина (Lys40, Lys61, Lys231, Lys383 и Lys395) и одного остатка глутамина (Glu397) были локализованы не полностью, что свидетельствует о наличии нескольких различных конформаций этих остатков. Все остатки с альтернативными конформациями и с отсутствующими в модели атомами боковой цепи находятся на поверхности белковой глобулы, что и объясняет их повышенную конформационную подвижность.

Существенным преимуществом атомного разрешения является возможность достоверно различать атомы углерода, кислорода и азота, что позволяет определять поворотные изомеры боковых цепей остатков аспарагина, глутамина и гистидина. Поворотные изомеры этих остатков обычно определяются из анализа водородных связей с окружающими атомами, что не всегда позволяет принять однозначное решение. При атомном разрешении изомеры остатков аспарагина и глутамина можно определить из анализа температурных факторов атомов азота и кислорода боковой цепи. Если в уточняемой модели карбок-

самидная группа аспарагина или глутамина развернута на 180 град относительно реально существующей в белковом кристалле конформации, то В-фактор атома азота будет значительно ниже, а В-фактор атома кислорода значительно выше, чем среднее значение температурных факторов валентно-связанных атомов. Аналогичная картина (более высокий В-фактор атомов азота Nδ и Nε и более низкий В-фактор атомов углерода Cδ и Cε) наблюдается и для неправильно развернутых боковых цепей остатков гистидина. Кроме того, при атомном разрешении атомы углерода, кислорода и азота могут быть различены на основе анализа карт электронной плотности, поскольку атомы с большим числом электронов имеют более высокие пики электронной плотности (рис. 2). Для проверки поворотных изомеров остатков аспарагина, глутамина и гистидина наряду с анализом электронной плотности проводился отдельный цикл уточнения с модифицированной моделью, в которой боковые цепи этих остатков были развернуты на 180 град. В результате в структуре комплекса МоФДГ-НАД<sup>+</sup>-азид с разрешением 1.1 Å были подтверждены поворотные изомеры большинства остатков, а боковые цепи остатков Gln66 и Asn135 были развернуты относительно их конформаций в структуре с разрешением 1.95 Å. Анализ температурных факторов не всегда приводил к однозначному выбору изомера, что свидетельствует о наличии обоих поворотных изомеров в структуре.

Структура активного центра МоФДГ со связанными молекулой НАД<sup>+</sup> и ионом азиды изображена на рис. 4. Подробное описание структуры активного центра ФДГ и роли отдельных аминокислотных остатков в связывании субстратов и катализе приведено в работах [12, 14]. Согласно результатам изучения кинетических изотопных эффектов скорость-лимитирующей стадией ферментативной реакции является перенос гидрид-иона, причем переходное состояние является поздним, т.е. его структура ближе к структуре продуктов реакции [20, 21]. Линейный ион азиды изоэлектронен продукту реакции CO<sub>2</sub>, также имеющему линейное строение, и характеризуется чрезвычайно высокой константой связывания с холо-формой ФДГ, на пять порядков превышающей константу связывания иона формиата [20]. В связи с этим тройной комплекс ФДГ-НАД<sup>+</sup>-

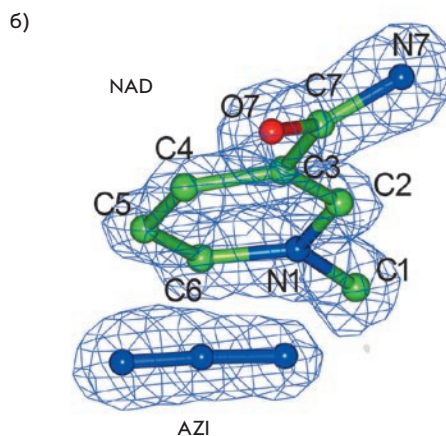
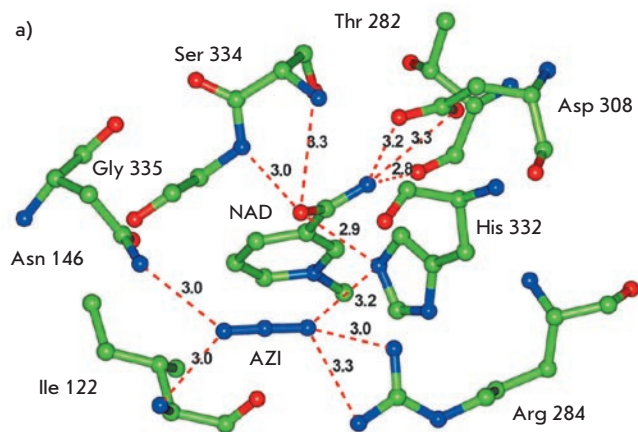


Рис. 4. Структура активного центра МоФДГ со связанными молекулой НАД<sup>+</sup> и ионом азиды: а) связывание никотинамидной части НАД<sup>+</sup> и азиды остатками активного центра, водородные связи обозначены пунктиром; б) карта электронной плотности с коэффициентами  $2|F_o| - |F_c|$  для НАД<sup>+</sup> и азиды с уровнем срезы 2.0 σ и номенклатура атомов никотинамидной части НАД<sup>+</sup>

азид рассматривается как стабильный аналог переходного состояния ферментативной реакции [20, 22].

Данные структуры с атомным разрешением подтвердили, что в активном центре МорФДГ карбоксамидная группа кофактора зафиксирована водородными связями с остатками активного центра в *транс*-конформации (атом O7 направлен в сторону атома C4), которая, согласно квантово-механическим расчетам для газовой фазы, на 2 ккал/моль менее выгодна, чем *цис*-конформация [23]. Кроме того, при анализе уточненной структуры выяснилось, что длина связи C7-O7 карбоксамидной группы кофактора составляет 1.26 Å, что на 0.03 Å больше стандартной длины двойной C-O связи в карбоксамидной группе (1.23 Å) [24]. При этом длина одинарной связи C3-C7 составляет 1.47 Å, что на 0.03 Å меньше стандартной длины (1.50 Å). Поскольку среднеквадратичное отклонение длин валентных связей в структуре составляет 0.015 Å, такие изменения длин связей между атомами с относительно низкими температурными факторами (O7 – 15.6 Å<sup>2</sup>, C7 – 13.7 Å<sup>2</sup>, C3 – 14.1 Å<sup>2</sup>) в глубине белковой молекулы могут указывать на изменение порядков этих связей. Обнаруженные особенности тройного комплекса МорФДГ-НАД<sup>+</sup>-азид могут отражать важные детали структурной организации переходного состояния реакции, катализируемой ФДГ.

Ранее расчетными теоретическими методами, сочетающими подходы молекулярной динамики и квантовой механики, было показано, что в переходном состоянии катализируемой ФДГ реакции молекула кофактора, находящаяся в энергетически-возбужденной *транс*-конформации, может приобретать характер т.н. биполярной формы [4]. Аналогичное положение было высказано и на основании исследования кинетических изотопных эффектов [21]. При этом должно наблюдаться возрастание отрицательного заряда на атоме O7 карбоксамидной группы, а также уменьшение длины связи C3-C7 и увеличение длины связи C7-O7 по сравнению с молекулой кофактора в свободном состоянии. Данные изменения способствуют увеличению

частичного положительного заряда на атоме C4 кофермента, повышая его электрофильность и тем самым благоприятствуя скорости-лимитирующему переносу гидрид-иона и протеканию ферментативной реакции.

Высокая точность дифракционных данных атомного разрешения дает возможность ослабить влияние стандартной стереохимии на координаты атомов никотинамидной группы кофактора в процессе кристаллографического уточнения структуры. В результате отдельного цикла уточнения программой REFMAC с ослабленными ограничениями на длины связей никотинамидной группы (путем увеличения от 0.02 Å до 0.20 Å стандартного среднеквадратичного отклонения длин этих связей) длина связи C7-O7 составила 1.29 Å, что на 0.06 Å короче стандартного значения, а длина связи C3-C7 составила 1.43 Å, что на 0.07 Å длиннее стандартного значения. Эти различия всего в 1.3 раза больше, чем ошибка в определении длин связей, оцененная как сумма двух средневзвешенных ошибок координат атомов (табл. 1). Тем не менее наши экспериментальные данные отражают тенденцию к изменению длин ковалентных связей, соответствующую приобретению никотинамидной группой кофактора характера биполярной формы в переходном состоянии ферментативной реакции.

Таким образом, впервые проведенное исследование структуры ФДГ при атомном разрешении позволяет глубже понять детали молекулярного механизма действия данного фермента и процессов переноса гидрид-иона в активных центрах НАД<sup>+</sup>-зависимых дегидрогеназ в целом. ●

*Настоящая работа поддержана Федеральным агентством по науке и инновациям (ГК № 02.512.12.2002) и РФФИ (грант № 08-04-00830-а).*

*Авторы благодарят филиал лаборатории EMBL в Гамбурге за предоставленное время работы на источнике синхротронного излучения и лично Александра Попова за помощь в сборе дифракционных данных.*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тишков В.И., Попов В.О. // Биохимия. 2004. Т. 69. № 11. С. 1537.
2. Vinals C., Depiereux E., Feytmans E. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1993. V. 192. № 1. P. 182.
3. Bandaria J.N., Dutta S., Hill S.E., Kohen A., Cheatum C.M. // J. Am. Chem. Soc. 2008. V. 130. № 1. P. 22.
4. Castillo R., Oliva M., Marti S., Moliner V. // J. Phys. Chem. B. 2008. V. 112. № 32. P. 10012.
5. Torres R.A., Schitt B., Bruice T.C. // J. Am. Chem. Soc. 1999. V. 121. № 36. P. 8164.
6. Dauter Z., Lamzin V.S., Wilson K.S. // Curr. Opin. Struct. Biol. 1997. V. 7. № 5. P. 681.
7. Rubach J.K., Plapp B.V. // Biochemistry. 2003. V. 42. № 10. P. 2907.
8. Meijers R., Morris R.J., Adolph H.W., Merli A., Lamzin V.S., et al. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. № 12. P. 9316.
9. Meijers R., Adolph H.W., Dauter Z., Wilson K.S., Lamzin V.S., et al. // Biochemistry. 2007. V. 46. № 18. P. 5446.
10. Schlieben N.H., Niefind K., Muller J., Riebel B., Hummel W., et al. // J. Mol. Biol. 2005. V. 349. № 4. P. 801.
11. Cameron A., Read J., Tranter R., Winter V.J., Sessions R.B., et al. // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. № 30. P. 31429.
12. Lamzin V.S., Dauter Z., Popov V.O., Harutyunyan E.H., Wilson K.S. // J. Mol. Biol. 1994. V. 236. № 3. P. 759.
13. Schirwitz K., Schmidt A., Lamzin V.S. // Protein Sci. 2007. V. 16. № 6. P. 1146.
14. Shabalina I.G., Filippova E.V., Polyakov K.M., Sadykhov E.G., Safonova T.N., et al. // Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 2009. V. 65. № 12. P. 1315.
15. Otwinowski Z., Minor W. // Methods in enzymology. 1997. V. 276. P. 307.
16. Murshudov G.N., Vagin A.A., Dodson E.J. // Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 1997. V. 53. № 3. P. 240.
17. Emsley P., Cowtan K. // Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 2004. V. 60. № 12. P. 2126.
18. Laskowski R.A., MacArthur M.W., Moss D.S., Thornton J.M. // J. Appl. Cryst. 1993. V. 26. № 2. P. 283.
19. Vaguine A.A., Richelle J., Wodak S.J. // Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 1999. V. 55. № 1. P. 191.
20. Blanchard J.S., Cleland W.W. // Biochemistry. 1980. V. 19. № 15. P. 3543.
21. Rotberg N.S., Cleland W.W. // Biochemistry. 1991. V. 30. № 16. P. 4068.
22. Popov V.O., Lamzin V.S. // Biochem. J. 1994. V. 301. № 3. P. 625.
23. Kahn K., Bruice T.C. // J. Am. Chem. Soc. 2001. V. 123. № 48. P. 11960.
24. Engh R.A., Huber R. // Acta Crystallogr. A Found. Crystallogr. 1991. V. 47. № 4. P. 392.

УДК 577.151.4

# Мутация остатка $\beta$ F71 в структуре пенициллинацилазы из *Escherichia coli* приводит к улучшению энантиоселективности и каталитических свойств

И.В. Шаповалова<sup>1</sup>, В.Б.Л. Алкема<sup>2</sup>, О.В. Ямскова<sup>1</sup>, Э. де Врис<sup>2</sup>, Д.Ф. Гуранда<sup>1</sup>,  
Д.Б. Янссен<sup>2</sup>, В.К. Швядас<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, МГУ

<sup>2</sup>Факультет биохимии, Гронингский институт биомолекулярных наук и биотехнологии, Университет Гронингена, Ниенборг 4, 9747 АГ Гронинген, Нидерланды

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

**РЕФЕРАТ** Остаток фенилаланина в положении 71  $\beta$ -цепи пенициллинацилазы из *E.coli* играет важную роль в связывании и хиральной дискриминации субстрата. В положение  $\beta$ F71 были введены различные аминокислотные остатки и исследована энантиоселективность и субстратная специфичность полученных мутантов. Для ряда мутантов обнаружено значительное увеличение каталитической активности. Введение мутаций в положение  $\beta$ F71 приводило также к увеличению энантиоселективности пенициллинацилазы. Каталитическая активность по отношению к специфическим субстратам увеличивалась до 36 раз, наиболее сильный эффект наблюдали в случае К-, R- и L-мутантов. Увеличение активности по отношению к производным D-фенилглицина, представляющее собой практически важное улучшение специфичности с точки зрения биокаталитического синтеза новых пенициллинов и цефалоспоринов, обнаружено для  $\beta$ F71R и  $\beta$ F71L-мутантов. Синтетическая активность пенициллинацилазы при использовании 6-аминопенициллановой кислоты в качестве внешнего нуклеофила была особенно чувствительна к мутации остатка  $\beta$ 71 в отличие от реакций ферментативного ацильного переноса на 7-аминодезацетоксицефалоспорованую кислоту.

**Ключевые слова:** пенициллинацилаза;  $\beta$ F71 мутанты; энантиоселективность; увеличение каталитической активности фермента.

## ВВЕДЕНИЕ

Пенициллинацилаза из *Escherichia coli* является наиболее изученным ферментом из недавно открытой группы Ntn-гидролаз. Для ферментов этого семейства характерен уникальный каталитический механизм, в котором N-концевой аминокислотный остаток (серин, цистеин или треонин) выступает в качестве нуклеофила, образуя промежуточный ацилфермент. ПАЗы, так же как и другие Ntn-гидролазы, активируются в результате процессинга белка-предшественника, образуя нативный фермент, имеющий в области активного центра характерный  $\alpha\beta$  мотив [1]. Несмотря на большой интерес к структуре и биосинтезу пенициллинацилаз [2–13], а также к новым областям их применения в биокатализе [14–20], субстратная специфичность и особенно энантиоселективность фермента изучены лишь в нескольких работах [21, 22]. Это обу-

словлено тем, что изучение субстратной специфичности по отношению к фенилацетильным производным осложняется сильное конкурентное ингибирование продуктом реакции фенилуксусной кислотой [23, 24]. По-видимому, ПАЗы могут превращать более широкий спектр субстратов, чем предполагалось ранее (особенно по отношению к входящей группе), и ферменты из разных источников могут обладать существенно отличающейся каталитической активностью и энантиоселективностью [24]. Субстратная специфичность и каталитические свойства ПАЗ представляют большой практический интерес, поскольку ферменты этого семейства играют ключевую роль в биокаталитическом получении полусинтетических  $\beta$ -лактамных антибиотиков [25].

Определение кристаллографических структур нативного фермента [2, 10] и аналогов фермент-субстратного комплекса [12, 13] привело к прорыву в установлении

каталитического механизма ПА из *E.coli*. Это предоставило первую информацию об аминокислотных остатках, вовлеченных в связывание уходящей группы субстрата. Применение методов молекулярного моделирования в дальнейшем помогло раскрыть более тонкие детали связывания субстрата в активном центре пенициллинацилазы [26]. Были обнаружены дополнительные взаимодействия уходящей группы субстрата с остатками  $\beta$ G385,  $\beta$ S386 и  $\beta$ N388, которые отсутствовали в кристаллографических структурах. На основании информации о структуре и данных молекулярного моделирования были определены ключевые аминокислотные остатки, контролирующие взаимодействия между ферментом и субстратом. Понимание этого является принципиально важным для рационального дизайна основных биокаталитических свойств, таких как субстратная специфичность, энантиоселективность и каталитическая активность. Было показано, что остаток F71  $\beta$ -цепи пенициллинацилазы является одним из основных аминокислотных остатков, взаимодействующих с уходящей группой субстратов. Таким образом, этот остаток представляет собой привлекательную мишень для мутагенеза, если мы хотим изменить каталитический потенциал пенициллинацилазы в процессах биокаталитической модификации  $\beta$ -лактамовых антибиотиков, получения хиральных аminosоединений и в других областях. В этой статье мы представляем результаты по изменению принципиально важных свойств ПА из *E.coli*: увеличению энантиоселективности и повышению каталитической активности. Эти изменения были достигнуты путем мутации одного аминокислотного остатка ( $\beta$ Phe71) в активном центре фермента.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Мутагенез остатка  $\beta$ F71 выполняли путем трех последовательных ПЦР. В первой стадии использовали BSTfw праймер, 5'-CAGGG AAGA ACCGGGAA AСТАТТG-3' в качестве прямого праймера и обратный праймер F71rv, содержащий мутацию в кодоне остатка  $\beta$ F71, 5'-AAAAАТАТCGACATCGTCGCCXXXACСТGCCGT-3'.

Подчеркнут кодон, отвечающий за остаток  $\beta$ F71. Во второй стадии использовали F71fw 5'-GGCGACGATGTCGATATTTTТТ-3' в качестве прямого праймера и NHErv 5'-САСТССТGCCAATTTTТТGGCСТТС-3' в качестве обратного праймера. Конечные продукты двух реакций отделяли в 2 %-ном агарозном геле и использовали затем в третьей стадии (без последовательностей, отвечающих нативному ферменту) ПЦР с добавлением праймеров NHErv и BSTfw. Конечные продукты, содержащие мутации в позиции  $\beta$ F71, разрезали для получения липких концов с помощью рестриктаз BstX1 and NheI и сшивали лигазой T4 в плазмиду pEC, расщепленную теми же ферментами. Полученную мутантную плазмиду использовали для трансформации компетентных клеток *E.coli*, согласно методике [27]. Полученные в результате трансформации последовательности секвенировали для подтверждения правильности мутации и отсутствия вторичной мутации по другому остатку. Экспрессию и очистку мутантов проводили так же, как для нативной пенициллинацилазы согласно [12].

Концентрацию активных центров пенициллинацилазы определяли титрованием с фенолметилсульфонилфторидом, как описано ранее [28]. Кинетические исследования проводили, анализируя начальные скорости соответствующих реакций, как описано в публикациях [24, 30]. Энантиоселективность (E) нативной пенициллинацилазы и ее мутантов определяли как соотношение констант скорости мутантов порядка, определенных при гидролизе индивидуальных энантиомеров,  $E = (k_{cat}/K_m)^L / (k_{cat}/K_m)^D$ , по методике, описанной ранее [21, 24].

При применении методов молекулярной динамики использовали пакет Gromacs ([www.gromacs.org](http://www.gromacs.org)), расчеты проводили, как описано в работе [26]. При молекулярном моделировании в качестве основы использовали кристаллическую структуру 1H2G-мутанта  $\beta$ F71 [29]. Молекулярный докинг был выполнен с использованием программы Lead-Finder компании ООО «МолТех», Россия ([www.moltech.ru](http://www.moltech.ru)).

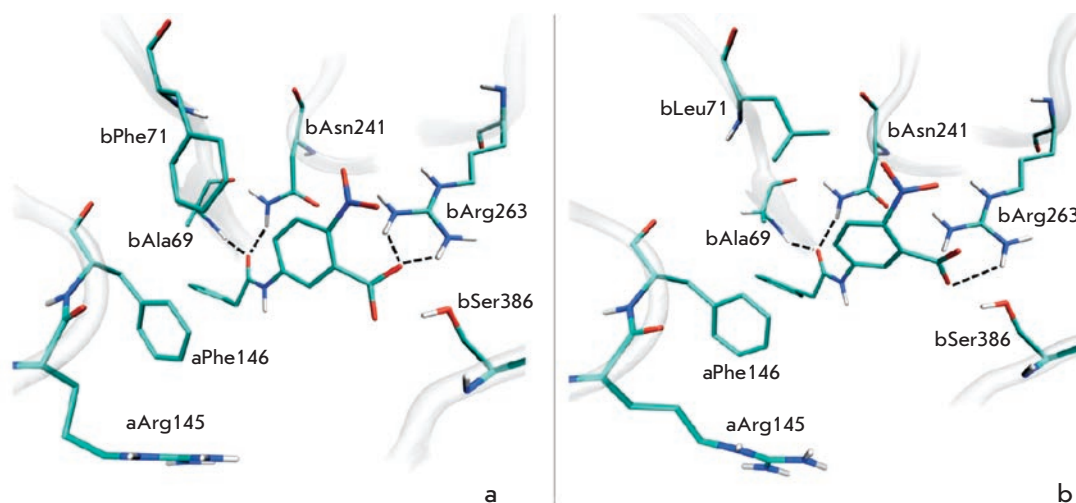


Рис. 1. Молекулярное моделирование фермент-субстратных комплексов для нативной пенициллинацилазы (a) и ее  $\beta$ F71L-мутанта (b) с N-(3-карбоксит-4-нитрофенил)фенилацетамидом. Взаимодействия субстрата с остатками оксианионного центра ( $\beta$ A69 и  $\beta$ N241) и остатком  $\beta$ R263 отмечены пунктирными линиями



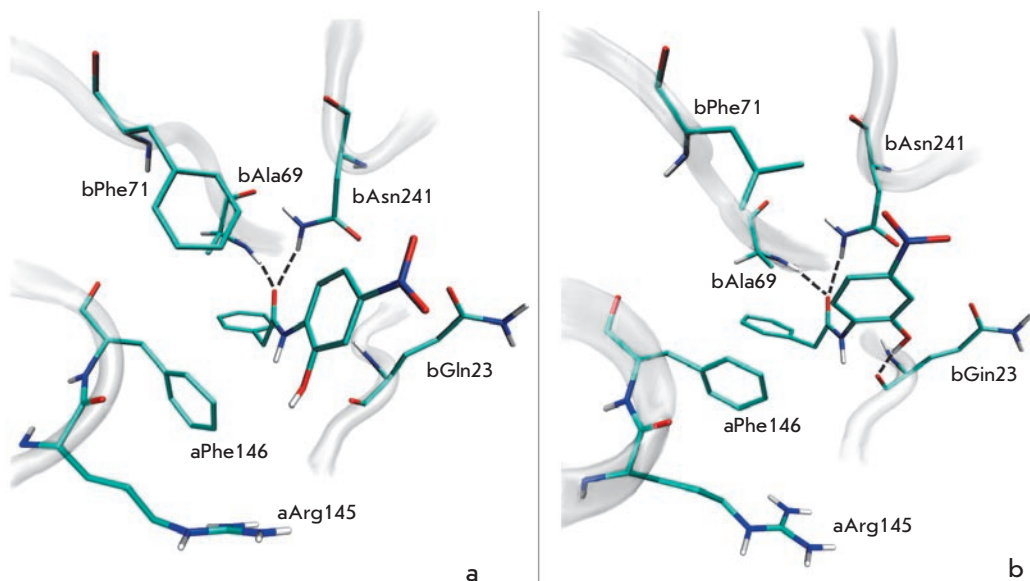


Рис. 2. Молекулярное моделирование фермент-субстратных комплексов для нативной пенициллинацилазы (а) и ее  $\beta$ F71L-мутанта (б) с N-(2-гидрокси-4-нитрофенил)фенилацетамидом. Взаимодействия субстрата с остатками оксианионного центра ( $\beta$ A69 и  $\beta$ N241) и остатком  $\beta$ Q23 отмечены пунктирными линиями

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Аминокислотный остаток F71  $\beta$ -цепи слегка сдвигается при связывании пенициллина G в активном центре пенициллинацилазы и располагается в непосредственной близости от  $\beta$ -лактамного кольца, образуя Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия. Молекулярное моделирование показывает, что остаток  $\beta$ F71 играет важную роль и в связывании других субстратов, например N-(3-карбокسي-4-нитрофенил)фенилацетамида (рис. 1а) и N-(2-гидрокси-4-нитрофенил)фенилацетамида (рис. 2а). Более того, мутация по этому аминокислотному остатку (рис. 1б и 2б) изменяет ориентацию субстрата и усиливает взаимодействия субстратов с оксианионным центром. Поэтому следовало ожидать, что мутация по остатку  $\beta$ 71 может увеличить каталитическую активность пенициллинацилазы и изменить стереоселективность, так же как и специфичность фермента по отношению к уходящей группе. Для проверки этого предположения были получены  $\beta$ F71-мутанты, содержащие различные функциональные группы в боковой цепи, и исследованы такие их свойства, как энантиоселективность и каталитическая активность по отношению к субстратам различной химической структуры. Все мутанты были каталитически активны, что свидетельствовало о том, что мутация по остатку  $\beta$ F71 не влияет на процессинг и правильное сворачивание мутантных ферментов. Фенилметилсульфонилфторид – хорошо известный необратимый ингибитор и реагент для титрования активных центров пенициллинацилазы [24, 28] был использован для определения концентрации активных центров мутантных ферментов. Титрование активных центров нативной пенициллинацилазы и ее мутантов позволило определить абсолютную каталитическую активность каждого биокатализатора и сравнить их каталитические свойства. Кинетические исследования включали измерение каталитической активности в реакции гидролиза фенилацетильных производных с различными, но структурно близкими уходящими группа-

ми, а также  $\alpha$ -аминозаместителем в ацильной группе. Энантиоселективность мутантов в реакции гидролиза N-фенилацетильных производных аминокислот использовали в качестве количественной меры хиральной дискриминации в области связывания уходящей группы. Наиболее значимые изменения, вызванные мутацией по аминокислотному остатку  $\beta$ F71, представлены ниже.

**КАТАЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ МУТАНТОВ**

Для сравнения каталитической эффективности действия нативной пенициллинацилазы и ее мутантов были проведены кинетические исследования гидролиза субстратов – производных фенилуксусной кислоты и D-фенилглицина, структура которых приведена на рис. 3. Видно, что при мутации остатка  $\beta$ F71 каталитическая активность пенициллинацилазы меняется очень сильно (рис. 4). Как и ожидалось, мутация меняет специфичность фермента по отношению к уходящей группе субстрата. Большинство из проверен-

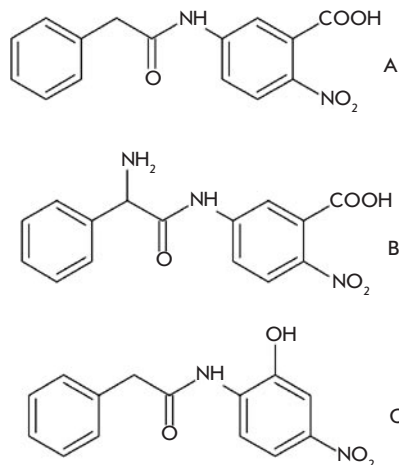


Рис. 3. Структура субстратов пенициллинацилазы, использованных для тестирования каталитической активности нативного фермента и его мутантов

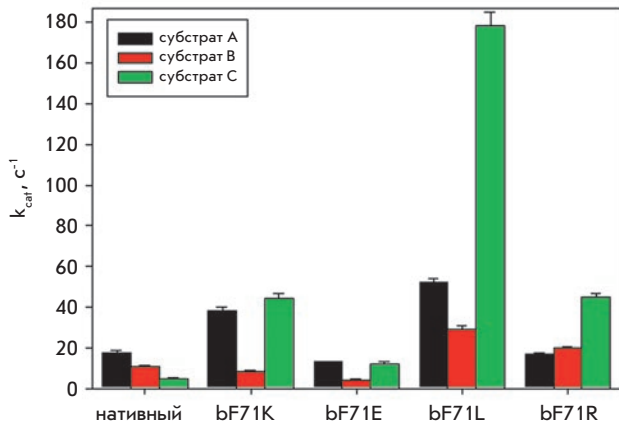


Рис. 4. Каталитическая активность нативной пенициллинацилазы и ее βF71-мутантов, выраженная как величины каталитических констант ферментативного гидролиза субстратов, представленных на рис. 3

ных нами мутантов показало увеличение каталитической активности, но это имело место только по отношению к выбранным субстратам. Наибольшее увеличение каталитической активности наблюдали в случае К-, R- и L-мутантов, в то время как в случае E-мутанта улучшение каталитических свойств было менее заметным. Для мутанта βF71E наблюдали также пониженное сродство к изучаемым субстратам. Из всех протестированных соединений наибольшее значение  $k_{cat}$  было показано для мутанта βF71L, что соответствует увеличению каталитической активности более чем в 36 раз по сравнению с нативной пенициллинацилазой.

К-, R- и L-мутанты обладали не только более высокой каталитической активностью по сравнению с натив-

ной пенициллинацилазой, но и более высоким сродством к субстратам (данные не приведены). Это показывает, что фенилаланин в положении 71 не является оптимальным аминокислотным остатком ни с точки зрения каталитической активности, ни с точки зрения сродства фермента к субстратам. Обнаружено также, что мутация по остатку βF71 приводит к изменению свойств участка связывания ацильной группы и улучшает специфичность пенициллинацилазы по отношению к производным D-фенилглицина, которые являются донорами ацильной части при ферментативном синтезе наиболее важных полусинтетических пенициллинов и цефалоспоринов, таких как ампициллин и цефалексин. Поиск ферментов, обладающих более высокой специфичностью к производным D-фенилглицина, имеет длительную историю [31–33], и никто не ожидал, что специфичность пенициллинацилазы из *E.coli* по отношению к этой группе соединений может быть улучшена. Тем не менее мутант βF71L показал более высокую специфичность, чем нативный фермент (значение  $k_{cat}/K_m$  увеличивается в 4.4 раза), что происходит как в результате увеличения каталитической активности, так и улучшения сродства к субстрату. Становится очевидным, что природа «оптимального» остатка в положении β71 зависит от структуры превращаемого ферментом субстрата. Наши результаты явно указывают, что мутация по остатку βF71 может быть использована для дизайна мутантных пенициллинацилаз с улучшенными каталитическими свойствами.

**РЕАКЦИОННАЯ СПОСОБНОСТЬ НУКЛЕОФИЛА**

Наиболее прямым количественным путем изучения эффекта мутации на связывание β-лактамного ядра при синтезе новых β-лактамных антибиотиков, катализируемом пенициллинацилазой, было бы измерение соответствующих констант связывания. Однако определение константы связывания нуклеофила на соответствующем участке активного центра фермента не представляется возможным ввиду сложной

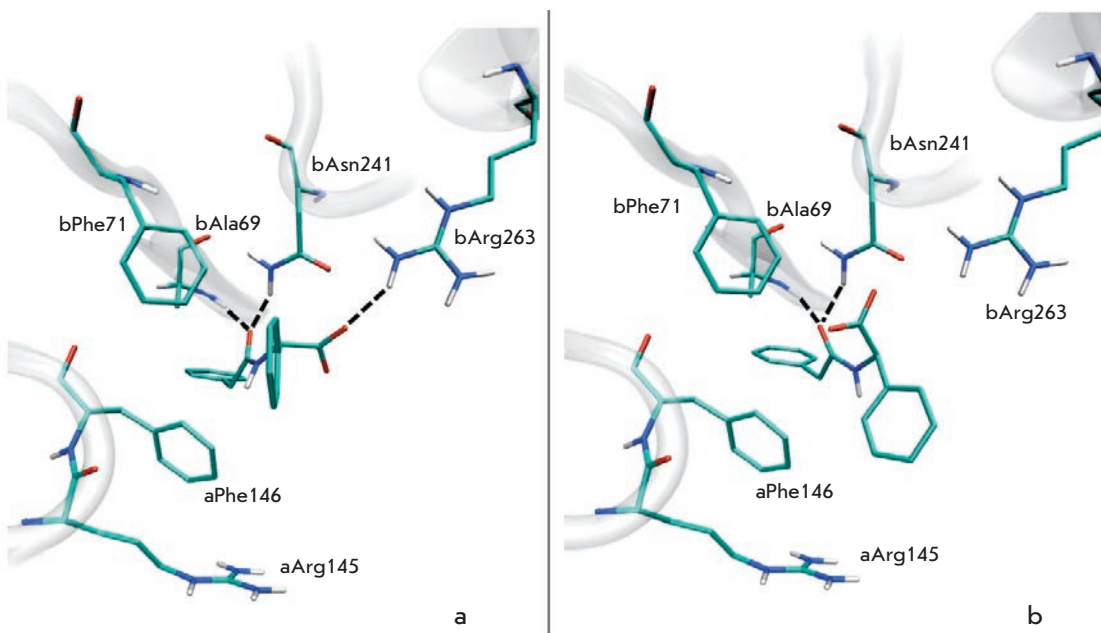


Рис. 5. Молекулярное моделирование фермент-субстратных комплексов нативной пенициллинацилазы с N-фенилацетил-L-фенилглицином (а) и N-фенилацетил-D-фенилглицином (б). Взаимодействия L-формы и D-формы с остатками оксианионного центра (βA69 и βN241) отмечены пунктирными линиями. Взаимодействия субстрата с остатком βR263 наблюдаются только для L-формы субстрата

**Таблица 1.** Соотношение начальных скоростей синтеза и гидролиза  $(S/H)_{im}$  при синтезе ампициллина, амоксициллина и цефалексина, катализируемом нативной пенициллинацилазой и ее  $\beta F71$ -мутантами, с использованием амидов D-фенилглицина (D-ФГА) и D-п-оксифенилглицина (D-ОФГА) в качестве доноров ацильной группы

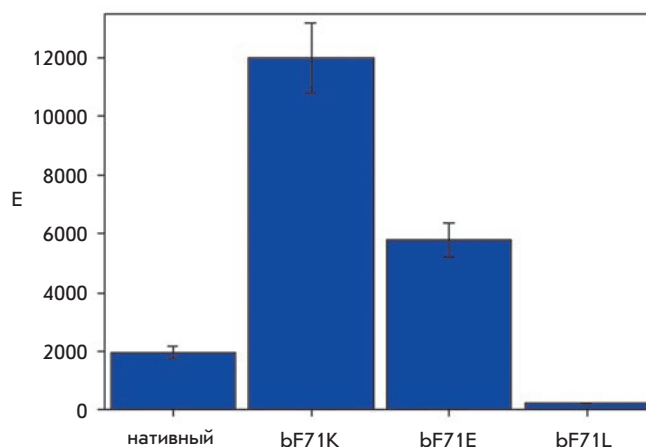
Фермент	D-ФГА/7-АДЦК	D-ФГА/6-АПК	D-ОФГА/6-АПК
нативный	9 ± 2	1.9 ± 0.1	1.2 ± 0.04
$\beta F71Y$	7.5 ± 0.4	0.74 ± 0.01	0.61 ± 0.03
$\beta F71L$	4.9 ± 0.4	0.94 ± 0.04	0.86 ± 0.03
$\beta F71W$	2.9 ± 0.2	0.77 ± 0.05	0.62 ± 0.03
$\beta F71R$	1.8 ± 0.03	0.76 ± 0.01	0.45 ± 0.01
$\beta F71K$	1.2 ± 0.01	0.51 ± 0.01	0.46 ± 0.02

Условия эксперимента: pH 7.0, 25 °C, 0.05 М фосфатный буфер, концентрация D-ФГА и D-ОФГА – 0.015 М, 6-АПК и 7-АДЦК – 0.025 М

кинетики реакций ацильного переноса, катализируемых ПА (возможно лишь определение комплексного кинетического параметра, куда входит значение константы связывания нуклеофила) [34]. Теоретический анализ показал, что наиболее адекватно взаимодействие нуклеофила с ферментом можно характеризовать как соотношение начальных скоростей синтеза и гидролиза  $(S/H)_{im}$ , изучая его зависимость от концентрации нуклеофила [35]. Исходя из этого было проведено кинетическое исследование с двумя различными донорами ацильной части и двумя нуклеофилами – ядрами  $\beta$ -лактамных антибиотиков 6-аминопенициллановой кислотой (6-АПК) или 7-аминодезацетоксифалоспоровановой кислотой (7-АДЦК). Результаты проведенного исследования показывают, что реакционная способность 6-АПК значительно более чувствительна к природе аминокислотного остатка в положении  $\beta F71$  по сравнению с 7-АДЦК (табл. 1). Очевидно, мутация остатка  $\beta F71$ , особенно замена фенилаланина на заряженный аминокислотный остаток, приводит к существенным изменениям в связывании  $\beta$ -лактамного кольца, и, в результате, меняется специфичность участка связывания уходящей группы.

### ЭНТИОСЕЛЕКТИВНОСТЬ

Поскольку остаток  $\beta F71$  располагается в области связывания уходящей группы субстрата, его мутация должна влиять на реакционную способность фермента по отношению к стереохимическим изомерам хиральных субстратов. При изучении этого эффекта в качестве количественного параметра мы выбрали величину энантиоселективности действия фермента  $E$  (соотношение значений  $k_{cat}/K_m$  гидролиза L- и D-энантиомеров субстрата) в реакции гидролиза N-фенилацетилных производных аминокислот. Хотя для нативной ПА характерна очень хорошая хиральная дискриминация по отношению к энантиомерам N-фенилацетил-фенилглицина благодаря ориентации L-формы субстрата в активном центре фермента при помощи остатка  $\beta R263$  (рис. 5), возможно дальнейшее увеличение энантиоселективности фермента (рис. 6). Было обнаружено, что мутант  $\beta F71L$ , который обладал наиболее



**Рис. 6.** Энантиоселективность ( $E$ ) нативной пенициллинацилазы и ее мутантов в реакциях гидролиза N-фенилацетил-фенилглицина, рассчитываемая как соотношение  $(k_{cat}/K_{m,L}) / (k_{cat}/K_{m,D})$

высокой каталитической активностью, характеризуется энантиоизбирательностью, меньшей по сравнению с нативным ферментом почти на один порядок, в то время как мутанты  $\beta F71E$  и  $\beta F71K$  обладают энантиоселективностью, большей в 3 и 6 раз соответственно. Положительный эффект мутации (т.е. высокая энантиоселективность) связан с уменьшением сродства к «низкоактивному» D-стереоизомеру, а отрицательный эффект вызван изменением реакционной способности обоих стереоизомеров (данные не показаны). Изучение энантиоселективности мутантов, так же как и их каталитической активности, показало, что каталитические свойства пенициллинацилазы могут быть тонко настроены путем мутации остатка  $\beta F71$  в соответствии с решаемой задачей и структурой превращаемого субстрата.

### ВЫВОДЫ

Природа остатка в положении  $\beta F71$  в структуре пенициллинацилазы из *E. coli* оказывает сильное влияние на каталитическую активность фермента и его способность к хиральной дискриминации энантиомеров субстрата. В зависимости от структуры превращаемого соединения мутации по остатку  $\beta F71$  могут ухудшить или улучшить каталитическую активность, энантиоселективность, а также сродство к субстрату. Одновременное улучшение всех основных каталитических свойств фермента для использования в биокатализе вряд ли представляется возможным, и фермент может быть тонко настроен для решения конкретной задачи в зависимости от структуры субстрата. Наличие информации о взаимосвязи структура/функция в семействе пенициллинацилаз, роли отдельных остатков и молекулярное моделирование могут облегчить дизайн пенициллинацилаз для различных биотехнологических задач. ●

*Работа была выполнена при поддержке Федерального агентства по науке и инновациям (государственный контракт 02.527.11.0001), программы ФП7 (совместный проект ЕС-РФ IRENE) и Министерства экономики Нидерландов.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Oinonen C., Rouvinen J. // *Protein Sci.* 2000. V. 9, P. 2329–2337.
2. Duggleby H.J., Tolley S.P., Hill C.P., Dodson E.J., Dodson G., Moody P.C.E. // *Nature.* 1995. V. 373. P. 264–268.
3. Brannigan J.A., Dodson G., Duggleby H.J., Moody P.C., Smith J.L., Tomchik D.R., Murzin A.G. // *Nature*, 1995, V. 378, P. 416–419.
4. Isupov M.N., Obmolova G., Butterworth S., Badet-Denisot M.A., Badet B., Polikarpov I., Littlechild J.A., Teplyakov A. // *Structure.* 1996. V. 4. P. 801–810.
5. Groll M., Ditzel L., Lowe J., Stock D., Bochtler M., Bartunik H.D., Huber R. // *Nature.* 1997. V. 386. P. 463–471.
6. Guo H.C., Xu Q., Buckley D., Guan C. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 20205–20212.
7. McDonough M.A., Klei H.E., Kelly J.A. // *Protein Sci.* 1999. V. 8. P. 1971–1981.
8. Suresh C.G., Pundle A.V., Rao K.N., SivaRaman H., Brannigan J.A., McVey C.E., Verma C.S., Dauter Z., Dodson E.J., Dodson G.G. // *Nature Struct. Biol.* 1999. V. 6. P. 414–416.
9. Schumacher G., Sizmann D., Haug H., Buckel P., Bock A. // *Nucleic Acid Res.* 1986. V.14. P. 5713–5727.
10. Done S.H., Brannigan J.A., Moody P.C.E., Hubbard R.E. // *J. Mol. Biol.* 1998. V. 284. P. 463–475.
11. Hewitt L., Kasche V., Lummer K., Lewis R.J., Murshudov G.N., Verma C.S., Dodson G.G., Wilson K.S. // *J. Mol. Biol.* 2000. V. 302. P. 887–898.
12. Alkema W.B.L., Hensgens C.M.H., Kroezinga E.H., De Vries E., Floris R., Van der Laan J.-M., Dijkstra B.W., Janssen D.B. // *Protein Eng.* 2000. V. 13. P. 857–863.
13. McVey C.E., Walsh M.A., Dodson G.G., Wilson K.S., Brannigan J.A. // *J. Mol. Biol.* 2001. V. 313. P. 139–150.
14. Baldaro E., D'Arrigo P., Pedrocchi-Fantoni G., Rosell C.M., Servi S., Tagliani A., Terreni M. // *Tetrahedron: Asymmetry.* 1993. V. 4. P. 1031–1034.
15. Waldmann H., Sebastian D. // *Chem. Rev.* 1994. V. 94. P. 911–937.
16. Soloshonok V.A., Soloshonok I.V., Kukhar V.P., Švedas V.K. // *J. Org. Chem.* 1998. V. 63. P. 1878–1884.
17. Topgi R.S., Ng J.S., Landis B., Wang P., Behling J.R. // *Bioorg. Med. Chem.* 1999. P. 2221–2229.
18. Basso A., De Martin L., Ebert C., Gardossi L., Linda P. // *J. Mol. Cat. B: Enzymatic.* 2001. V. 16. P. 73–80.
19. Guranda D.T., Van Langen L.M., Van Rantwijk F., Sheldon R.A., Švedas V.K. // *Tetrahedron: Asymmetry.* 2001. V. 12. P. 1645–1650.
20. Guranda D.T., Khimiuk A.I., Van Langen L.M., Van Rantwijk F., Sheldon R.A., Švedas V.K. // *Tetrahedron: Asymmetry.* 2004. V. 15. P. 2901–2906.
21. Švedas V.K., Savchenko M.V., Beltser A.I., Guranda D.F. // *Annals N.Y. Acad. Sci.* 1996. V. 799. P. 659–669.
22. Galunsky B., Lummer K., Kasche V. // *Monatsh. Chem.* 2000. V. 131. P. 623–632.
23. Березин И.В., Клесов А.А., Ныс П.С., Савицкая Е.М., Швядас В.К. // *Антибиотики.* 1974. Т. 19. С. 880–887.
24. Švedas V.K., Guranda D.T., Van Langen L.M., Van Rantwijk F., Sheldon R.A. // *FEBS Lett.* 1997. V. 417. P. 414–418.
25. Bruggink A., Roos E.C., De Vroom E. // *Org. Process Res. Dev.* 1998. V. 2. P. 128–133.
26. Чилов Г.Г., Строганов О.В., Швядас В.К. // *Биохимия*, 2008. Т. 73. № 1. С. 69–79.
27. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. // *Molecular cloning, a laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
28. Швядас В.К., Марголин А.Л., Шерстюк С.Ф., Клесов А.А., Березин И.В. // *Биоорганическая химия.* 1977. № 3. С. 546–554.
29. Morillas M., McVey C.E., Brannigan J.A., Ladurner A.G., Forney L.G., Virden L. // *Biochem. J.* 2003. V. 371. P. 143–150.
30. Юшко М.И., Шамолина Т.А., Гуранда Д.Ф., Синев А.В., Швядас В.К. // *Биохимия.* 1998. Т. 63. № 9. С. 1295–1300.
31. Takahashi T., Yamazaki Y., Kato K., Isona M. // *J. Am. Chem. Soc.* 1972. V. 94. P. 4035–4037.
32. Blinkovsky A.M., Markaryan A.N. // *Enzyme Microb. Technol.* 1993. V. 15. P. 965–973.
33. Polderman-Tijmes J.J., Jekel P.A., van Merode A., Floris T.A.G., van der Laan J.-M., Sonke T., Janssen D.B. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2002. V. 68. P. 211–218.
34. Юшко М.И., Швядас В.К. // *Биохимия.* 2000. Т. 65. № 12. С. 1624–1633.
35. Youshko M.I., Chilov G.G., Shcherbakova T.A., Svedas V.K. // *Biochim. Biophys. Acta: Proteins & Proteomics.* 2002. V. 1599. № 1–2. P. 134–140.

УДК 577.539.199

# Генотоксические эффекты наночастиц серебра при воздействии на млекопитающих *in vivo*

Л.К. Рамайя<sup>1</sup>, К.Г. Орджоникидзе<sup>1</sup>, Е.М. Егорова<sup>2</sup>, \*А.В. Рубанович<sup>1</sup><sup>1</sup> Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991, Москва, ул. Губкина, 3<sup>2</sup> НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8<sup>2</sup> Научно-производственная компания «Наномет», Москва, Долгоруковская ул., 33/2

\*E-mail: rubanovich@vigg.ru

**РЕФЕРАТ** Приводятся данные по токсическим и генотоксическим эффектам водного раствора наночастиц серебра (НЧС) при инъекции лабораторным мышам линии BALB/c *in vivo*. Действие НЧС сравнивалось с эффектами водных растворов нитрата серебра и анионного ПАВ (АОТ), используемого в качестве стабилизатора наночастиц. Показано, что токсическое действие изученных растворов падает в ряду: НЧС > АОТ >> AgNO<sub>3</sub>. Регрессионный анализ зависимости гибели мышей от концентрации показал, что полумлетальные дозы (ЛД<sub>50/30</sub>) растворов НЧС и АОТ равны  $(2.7 \pm 0.7) \cdot 10^{-3}$  г-ион/л и  $29.9 \pm 4.8$  мМ, или  $(0.30 \pm 0.07)$  гAg/л и  $13.3 \pm 2.1$  гAg/л соответственно. Для регистрации генетических эффектов при концентрациях  $\frac{1}{2}$ ЛД<sub>50</sub> были использованы два теста: частота появления аномальных головок спермиев (АГС) и степень повреждения ДНК лимфоцитов и других клеток селезенки, выявляемая методом ДНК-комет. Оба теста не обнаружили дополнительные генетические эффекты НЧС по сравнению с АОТ.

**Ключевые слова:** наночастицы серебра, мыши, летальное действие, половые клетки, первичные повреждения ДНК.

**Список сокращений:** НЧС – наночастицы серебра, АОТ – аэрозоль-ОТ, ЛД – летальное действие, АГС – аномальные головки спермиев, ПАВ – поверхностно-активное вещество.

## ВВЕДЕНИЕ

Применение продуктов нанотехнологий в настоящее время расширяется во всех областях жизнедеятельности человека. В связи с этим возникла необходимость изучения биологических эффектов различных наночастиц и нанокompозитных материалов, прежде всего действия их на организм человека и животных. Главная задача здесь состоит в определении степени токсичности наночастиц для человека и, соответственно, потенциального риска использования наночастиц и препаратов на их основе. Наибольший интерес представляют исследования биологического действия металлических наночастиц, т.к. они наиболее часто служат объектом прикладных разработок в различных областях промышленности и медицины. За последнее десятилетие накоплены данные как о положительном (лечебный эффект), так и об отрицательном (стимуляция возникновения различных заболеваний) воздействии наночастиц металлов на живые организмы [1, 2]. Одним из наиболее популярных объектов исследований являются наночастицы серебра, поскольку они активно используются в последнее время в производстве различных товаров широкого потребления – пищевых добавок, одежды, бытовой техники, игрушек и др. Работы проводятся главным образом на бактериях с целью определения антимикробной активности наночастиц [3–5] или на клеточных культурах *in vitro*

(напр., [6]), а также имеются сведения о действии наночастиц на фибробласты человека [7]. Данные о действии наночастиц серебра и других металлов на высшие организмы весьма немногочисленны. До настоящего времени практически отсутствуют сведения о биологическом и генетическом эффектах наночастиц серебра при поступлении их в организм млекопитающих.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В настоящей работе изучались токсические и генотоксические эффекты наночастиц серебра (НЧС) при воздействии на мышей *in vivo*.

Наночастицы серебра были получены методом биохимического синтеза в обратных мицеллах [8, 9] путем восстановления ионов металла биологически активным веществом из группы флавоноидов. Синтез проводился в тройной системе: водный раствор соли серебра/АОТ/изооктан, где АОТ – анионное поверхностно-активное вещество (ПАВ), используемое в качестве стабилизатора наночастиц. Метод позволяет получать наночастицы серебра и других металлов, стабильные на воздухе в мицеллярном растворе в течение длительного времени; более подробные сведения о методе и свойствах наночастиц серебра даны в ряде опубликованных ранее работ (напр., [10–12]). Из полученного таким способом мицеллярного раствора

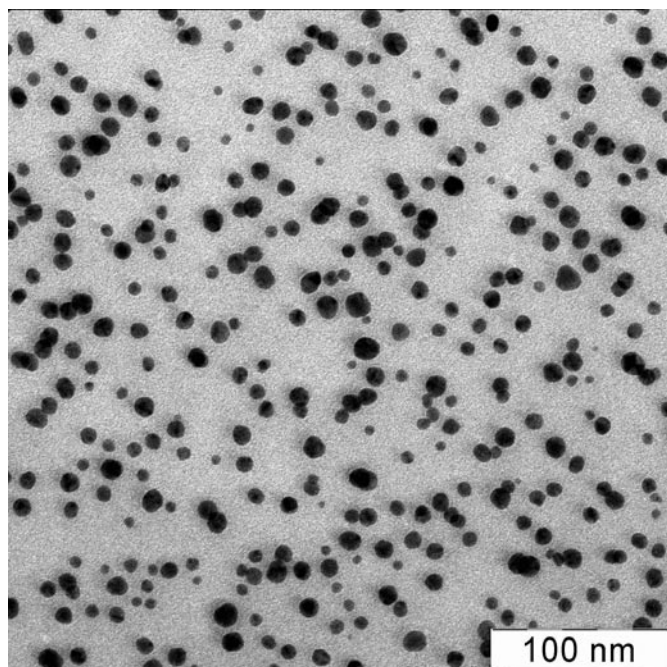


Рис. 1. Электронная микрофотография наночастиц серебра

наночастиц готовят их водный раствор по разработанной ранее стандартной методике [13]. В водном растворе наночастицы существуют в оболочке – бислое из молекул АОТ, внешняя поверхность которого несет отрицательный заряд вследствие диссоциации ионогенных групп этого ПАВ. Кроме наночастиц, в растворе присутствует также избыток АОТ; концентрация АОТ в водном растворе определяется по стандартной методике (ГОСТ Р-51211-98). В исследованиях биологического действия водных растворов наночастиц это позволяет ставить контрольные эксперименты по определению действия этого ПАВ в соответствующей концентрации. Как установлено в проводившихся ранее исследованиях, водные растворы наночастиц серебра обладают выраженной антибактериальной и противовирусной активностью [14], а также сильным токсическим действием на плазмодий слизевого гриба *Physarum polycephalum* [10]. В экспериментах на плазмодии было показано, что токсическое действие наночастиц существенно превышает таковое для водных растворов АОТ и ионов серебра в эквивалентной концентрации.

Электронная микрофотография наночастиц, использованных в настоящей работе, приведена на рис. 1. Частицы сферические, средний размер для выборки из 600 частиц составляет  $9 \pm 6$  нм.

Начальная концентрация НЧС в водном растворе (далее – препарат НЧС) составляла 0.54 г/л. Действие препарата НЧС сравнивалось с действием АОТ и ионов  $Ag^+$  в эквивалентных концентрациях. Для этого использовали водные растворы АОТ (начальная концентрация 6.7 г/л) и азотнокислого серебра (начальная концентрация 0.85 г/л).

Опыты проводили на лабораторных мышах (самцах и самках) линии BALB/c в возрасте 3–4 мес. с массой тела 30–35 г. Для установления процента выживаемости мышей и дозы препарата, вызывающей 50 % гибели, животные были разделены на четыре группы по 16 голов в каждой. Мышам 1-й группы вводили однократно внутривентриально раствор НЧС в дистиллированной воде по 0.2 мл. Концентрации НЧС в растворе варьировали путем разбавления исходного препарата в 0; 1.5; 2; 3; 5; 7; 10 и 100 раз. Соответственно концентрации НЧС в растворе составляли: 0.54; 0.36; 0.27; 0.18; 0.11; 0.077; 0.054 и 0.0054 г/л.

Во 2-й группе мышам вводили водный раствор АОТ в концентрациях, соответствующих тем, которые были инъецированы животным 1-й группы. Для ряда концентраций НЧС, указанных выше, эквивалентные концентрации АОТ составляли: 6.7; 4.5; 3.4; 2.2; 1.34; 0.96; 0.67 и 0.067 г/л.

Мышам 3-й группы вводили водный раствор  $AgNO_3$  в концентрациях 5, 0.5 и 0.05 мМ, соответствующих разведениям препарата НЧС в 0; 10 и 100 раз.

4-я группа составляла биологический контроль, им вводили по 0.2 мл дистиллированной воды.

Определение летального действия вводимых растворов производилось по стандартной методике. Все инъецированные мыши в течение 30 сут содержались в виварии, и ежедневно велся учет павших животных. Наблюдение за физическим состоянием животных показало, что в первые часы после инъекции у мышей первой группы при двух наибольших дозах (0.54 и 0.36 г/л) НЧС наступало снижение двигательной активности, возникали судороги и в дальнейшем паралич задних конечностей. Смерть наступала через 12–24 ч после введения препарата. Можно предположить, что причиной смерти является воздействие нанопрепарата на нервную ткань; вскрытие погибших животных не показало видимых нарушений в тканях или кровоизлияний во внутренних органах. У остальных мышей этой группы, при меньшей концентрации препарата, признаки общего угнетения и внешнего проявления токсикоза в первые часы после инъекции были менее выражены, и состояние этих мышей практически не отличалось от контроля. Гибель мышей в этой группе наступала и при более низких концентрациях, однако длительность жизни павших животных была несколько больше (9–10 дней), чем при высоких дозах (1–3 дня).

В группе 2 смерть мышей отмечалась только в трех случаях, при достаточно высоких концентрациях АОТ (6.7; 4.5; 3.4 г/л). Более низкие концентрации АОТ не вызывали гибели животных. В группах 3 и 4 гибели мышей в течение 30 сут не наблюдалось.

Зависимости гибели мышей от концентрации растворов представлены на рис. 2.

Из данных рис. 2 следует, что выживаемость животных монотонно падала с увеличением концентрации введенного раствора НЧС за исключением наименьшей концентрации (0.0054 г/л – разведение в 100 раз). Регрессионный анализ данных по выживаемости мышей позволил оценить полулетальные дозы ( $LD_{50/30}$ ) для исследованных препаратов.  $LD_{50/30}$  для препарата НЧС оказалась равной  $0.30 \pm 0.07$  г/л при концентрации АОТ, равной 3.7 г/л (разведение в 1.8 раза). Экстраполяция данных показывает, что  $LD_{50/30}$  для АОТ без наночастиц равна  $13.3 \pm 2.1$  г/л.

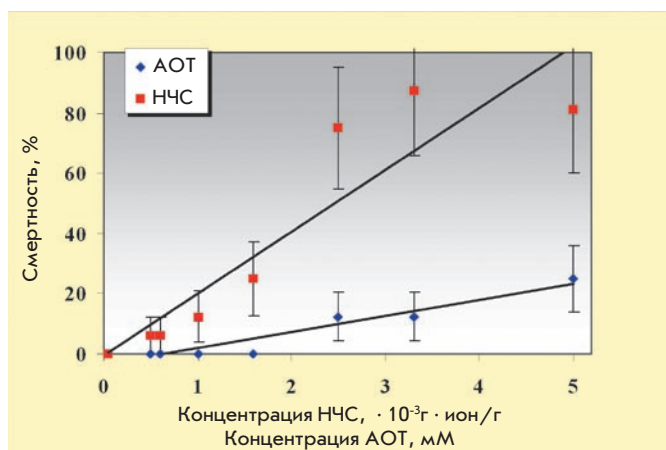


Рис. 2. Смертность мышей при инъекции препарата НЧС и раствора АОТ в зависимости от концентрации

Таким образом, можно считать, что токсический эффект наночастиц серебра в 3.6 раз превышает эффект АОТ. Отсутствие летального эффекта в группе мышей, которым вводили нитрат серебра, показывает также, что из трех исследованных здесь агентов ионы  $Ag^+$  обладают наименее выраженным токсическим действием. Иначе говоря, токсическое действие падает в ряду: НЧС > АОТ >>  $AgNO_3$ .

Для изучения действия препарата НЧС на половые клетки млекопитающих был выбран показатель частоты появления аномальных головок спермиев (АГС) через 21 день после введения препарата. Этот метод позволяет определить повреждающий эффект препарата в половых клетках на ранней премеитической стадии гаметогенеза, т.е. в пахитене первого мейотического деления. Считается, что появление АГС обуславливается либо крупными хромосомными aberrациями, такими как транслокации, либо точечными мутациями и мелкими делециями, либо они являются следствием соматических повреждений. Ранее было показано, что воздействие на самцов мышей некоторых физических (ионизирующая радиация, СВЧ) и химических факторов (циклофосфамид, хлористый кадмий, хлористый цинк и др.) вызывало повышение частоты АГС, сопровождающееся снижением массы семенников, увеличением доимплантационных потерь в эмбриогенезе и снижением уровня эффективных скрещиваний при действии на премеитические клетки самцов мышей. Эти факты указывают не только на мутагенный, но также на цитолитический и/или цитотоксический эффект воздействия [16]. Метод определения частоты АГС достаточно прост, не требует большого количества животных и может использоваться для первоначального определения мутагенного эффекта препарата [17].

На рис. 3а представлены данные по частоте АГС при введении самцам мышей растворов АОТ и НЧС в концентрации 2.2 г/л и 0.18 г/л соответственно (разведение исходных препаратов в 3 раза). Приведенные на рис. 3а результаты говорят о более высоком (примерно в 1.5 раза)

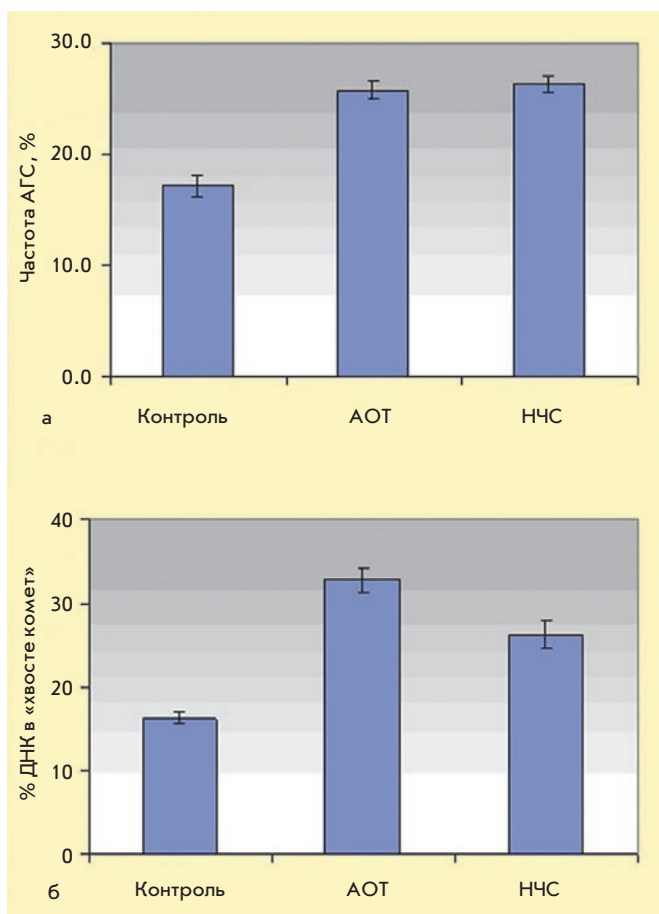


Рис. 3. Частота АГС (а) и доля ДНК вышедшей из клетки в «хвост кометы» (б) при введении самцам мышей растворов АОТ и НЧС в концентрации 2.2 г/л и 0.18 г/л соответственно (разведение исходных препаратов в 3 раза)

повреждающем эффекте НЧС и АОТ по сравнению с контролем. При этом различия между эффектами АОТ и НЧС практически отсутствуют.

Параллельно на тех же животных был проведен анализ первичных ДНК-повреждений методом нейтрального гель-электрофореза единичных клеток (ДНК-комет). ДНК-повреждения (в виде одиночных и двойных разрывов) являются индикаторами таких процессов, как окислительный стресс и клеточная гибель. Метод ДНК-комет позволяет в определенной степени регистрировать факт возможного индуцированного мутагенеза по относительному количеству поврежденной ДНК.

Анализ проводился по стандартной методике [18]. В качестве органа-мишени была выбрана селезенка как орган, несущий специфические функции в системе кровообращения. Накопленные в белой и красной пульпе лимфоциты, моноциты и макрофаги могут быть повреждены наночастицами. Метод основан на регистрации различной подвижности в постоянном электрическом поле ДНК и возможных фрагментов ДНК лизированных клеток, заключенных в агарозный гель.

С помощью этого метода определялась степень повреждения ДНК после введения препарата НЧС и раствора АОТ в концентрации 0.17 и 2.2 г/л соответственно. Не обнаружено снижения процента ДНК в «хвосте комет» вплоть до 48 ч после инъекции. На рис. 3б представлены усредненные данные по 14 мышам и 7 временным точкам (3, 5, 7, 9, 12, 24 и 48 ч). Рисунок демонстрирует, что АОТ оказывает повреждающее действие на ДНК, превышающее соответствующие эффекты для НЧС. Доля ДНК, вышедшей в «хвосте кометы», составила  $32.8 \pm 1.5\%$  для АОТ против  $26.3 \pm 1.7\%$  для НЧС. Оба показателя достоверно превышали контрольный уровень ( $16.2 \pm 0.7\%$ ).

## ВЫВОДЫ

В данной работе впервые показано, что наночастицы серебра, полученные методом биохимического синтеза, оказывают летальное воздействие на организм млекопитающих при инъекции *in vivo*. Летальный эффект наночастиц примерно в 4 раза превышает таковой для АОТ (см. рис. 2), в то время как при введении эквивалентных количеств ионов серебра выживаемость животных была 100 %-ной.

Анализ результатов показывает, что наночастицы серебра, полученные методом биохимического синтеза, при инъекции мышам *in vivo* оказывают летальное воздействие. Летальный эффект наночастиц заметно превышает таковой для АОТ, в то время как ионы серебра вообще не вызывают гибели животных. Отсюда следует, что водная дисперсия наночастиц серебра оказывает на организм мле-

копитающих существенно более выраженное токсическое действие, чем поверхностно-активное вещество, входящее в состав препарата НЧС. Такой же вывод был сделан по результатам тестирования биологических эффектов препарата НЧС на плазмодии *Physarum polycephalum* [10] и (для сравнения НЧС и ионов серебра) на клетках *E.coli* [9]. В исследованиях генотоксического действия наночастиц серебра по тестам АГС и ДНК-комет не удалось обнаружить дополнительных генетических эффектов НЧС по сравнению с АОТ. Следует отметить, что применение растворов НЧС, видимо, должно быть индивидуально нормировано с учетом чувствительности биологического объекта.

Настоящая публикация содержит результаты предварительного анализа генотоксических эффектов наночастиц серебра при воздействии на млекопитающих *in vivo*. В дальнейших исследованиях предполагается выяснить генетический эффект наночастиц металлов у млекопитающих и растений. ●

*Работа поддержана договором о выполнении НИР № 8418-16/09 с ООО «Наномет». Авторы благодарят чл.-корр. РАН, проф. Н.К. Янковского (ИОГЕН РАН) за обсуждение результатов и В.С. Лысенкову, старшего лаборанта лаборатории экологической генетики ИОГЕН РАН за техническую помощь в выполнении работы.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Salata O.V. Applications of nanoparticles in biology and medicine. // *Journal of Nanobiotechnology*. 2004. 2:3doi:10.1186/1477-3155-2-3.
- Oberdorster G., Oberdorster E., Oberdorster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. // *Environmental health perspectives*. 2005. V. 113. № 7. P. 823.
- Лопанов А.Н. Серебро. СПб.: Arat, 2005. 399 с.
- Neal A.L. What can be inferred from bacterium-nanoparticle interactions about the potential consequences of environmental exposure to nanoparticles? // *Ecotoxicology*. 2008. V. 17. P. 362.
- Sondi I., Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E.coli* as a model for Gram-negative bacteria. // *J. Colloid Interface Sci*. 2004. V. 275. P. 177.
- Braydich-Stolle L., Hussain S., Schlager J.J. et al. In Vitro Cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. // *Toxicological sciences*. 2005.V. 88. Iss. 2. P. 412.
- Hui Yang, Chao Liu, Danfeng Yang, Yuashan Zhang and Zhuge Xi. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition. // *J. Appl. Toxicol*. 2009. V. 29. P. 69–78.
- Егорова Е.М., Ревина А.А., Кондратьева В.С. Способ получения наноструктурных металлических частиц. Патент РФ №2147487.
- Egorova E.M., Revina A.A. // *Colloids and Surfaces A*. 2000. V. 168. P. 87.
- Егорова Е.М., Ревина А.А. // *Коллоидный журн*. 2002. Т. 64. С. 334.
- Егорова Е.М., Ревина А.А., Ростовщикова Т.Н., Киселева О.И. // *Вестник МГУ. Сер.2. Химия*. 2001. Т. 42. С. 332.
- Егорова Е.М., Ревина А.А. // *Журнал физической химии*. 2003. Т. 77. С. 1683.
- Егорова Е.М., Ревина А.А., Румянцев Б.В. и др. // *Журнал прикладной химии*. 2002. Т. 75. С. 1620.
- Егорова Е.М. Наночастицы металлов в растворах: биохимический синтез, свойства и применение. // *Нанотехника*. 2004. № 1. С. 15.
- Матвеева Н.Б., Егорова Е.М., Бейлина С.И., Леднев В.В. Хемотаксис как способ тестирования биологических эффектов наноразмерных частиц серебра. // *Биофизика*. 2006. Т. 51. № 3. С. 859.
- М.Д. Померанцева, Л.К. Рамайя, Г.А. Вилкина. Сравнительная эффективность использования разных тестов для определения мутагенности некоторых факторов у млекопитающих. Сообщение II. Частота аномальных головок спермиев у мышей, подвергшихся воздействию различных факторов. // *Генетика*. 1980. Т. XVI, № 8. С. 1397–1403.
- W.R. Bruce, R. Furrer, A.J. Wyrobec. Abnormalities in the shape of murine sperm after acute testicular X-irradiation. // *Mutat.Res*. 1974. V. 23. № 3. P. 381.
- P.L. Olive and J.P.Banath. Detection of DNA double-strand breaks through the cell cycle after exposure to X-rays, bleomycin, etoposide and <sup>125</sup>Ird. // *Int.J.Radiat.Biol*. 1993. V. 64. № 4. P. 349–358.



УДК 575.22

# Комбинирование двух технологических платформ для полногеномного секвенирования человека

К.Г. Скрыбин<sup>1</sup>, Е.Б. Прохорчук<sup>1\*</sup>, А.М. Мазур<sup>1</sup>, Е.С. Булыгина<sup>1</sup>, С.В. Цыганкова<sup>1</sup>,  
А.В. Недолужко<sup>1</sup>, С.М. Расторгуев<sup>1</sup>, В.Б. Матвеев<sup>2</sup>, Н.Н. Чеканов<sup>3</sup>, Д.А. Горанская<sup>3</sup>,  
А.Б. Теслюк<sup>1</sup>, Н.М. Груздева<sup>1</sup>, В.Е. Велихов<sup>1</sup>, Д.Г. Заридзе<sup>2</sup>, М.В. Ковальчук<sup>1</sup>

<sup>1</sup>РНЦ «Курчатовский институт», 123182, Москва, пл. Академика Курчатова, 1

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт канцерогенеза ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, 115478, Москва, Каширское ш., 24

<sup>3</sup>Центр «Биоинженерия» РАН, 117312, Москва, просп. 60-летия Октября, 7, корп. 1

\*E-mail: Prokhortchouk@biengi.ac.ru

**РЕФЕРАТ** В настоящее время стремительно развиваются новые технологии секвенирования ДНК, позволяющие быстро и эффективно определять особенности организмов на уровне строения их геномов. В данном исследовании впервые в России было проведено полногеномное секвенирование человека (русского, мужчины) с использованием двух из представленных на современном рынке технологий – циклического лигазного секвенирования SOLiDTM (Applied Biosystems) и технологии секвенирования на молекулярных кластерах с использованием флуоресцентно меченных предшественников на приборе GAII (Illumina). Общее количество накопленных данных о ДНК исследованного генома составило 108.3 млрд нуклеотидных оснований (60.2 млрд с помощью технологии Illumina и 48.1 млрд с помощью технологии SOLiD). Проведенный статистический анализ результатов показал, что данные секвенаторов GAII и SOLiD дают информацию приблизительно о 75 и 96 % генома соответственно. Точность определения коротких полиморфных районов приблизительно одинакова у двух платформ, однако за счет меньшей плотности покрытия платформа SOLiD может предсказывать меньшее количество полиморфизмов. Был установлен оптимальный алгоритм использования новейших методов определения первичной последовательности ДНК при секвенировании индивидуальных геномов человека. Данное исследование является первой российской работой по полногеномному секвенированию человека.

**Ключевые слова:** геном человека, технологии секвенирования, однонуклеотидные полиморфизмы

**Список сокращений:** ОП – однонуклеотидный полиморфизм делеции/инсерции.

## ВВЕДЕНИЕ

С совершенствованием новых технологий секвенирования ДНК, позволяющих быстро и эффективно определять особенности организмов на уровне строения их геномов, геномика стала одной из самых быстроразвивающихся дисциплин. На сегодняшний день существуют три основные новейшие технологии секвенирования ДНК: технология пиросеквенирования, реализованная в секвенаторах нового поколения (GS FLX, 454 Life Science Inc./Roche), технология циклического лигазного секвенирования (SOLiD, Applied Biosystems) и технология секвенирования на молекулярных кластерах с использованием флуоресцентно меченных предшественников (Illumina). Эти платформы уже продемонстрировали свою состоятельность – за последние два года к уже известному геному человека, последовательность которого была определена рядом ведущих институтов Соединенных Штатов (США), Великобритании и Канады в течение 10 лет при общей стоимости проекта 3 млрд долларов [1], добавились пять новых: геномы выдающихся биологов современности [2, 3], африканца нигерийского происхождения [4, 5], китайца [6] и корейца [7],

не считая геномов других эукариотических и прокариотических организмов [8]. Все эти работы стали возможны именно благодаря новым технологиям, связанным с увеличением производительности секвенирования и его значительным удешевлением. В обозримом будущем количество изученных геномов будет увеличиваться в геометрической прогрессии, так, например, основные мировые научные державы включились в совместный проект под эгидой Европейского союза, США и Китая под названием «1000 геномов» (<http://www.1000genomes.org>). Однако, несмотря на значительный прогресс, достигнутый в развитии технологий «чтения» ДНК, секвенирование крупных геномов, в т.ч. и генома человека, остается нетривиальной задачей. В настоящее время не существует стандартных подходов к анализу этих геномов, а также нет полных и объективных данных по оценке эффективности описанных выше технологий.

В представленной работе впервые в России было проведено полногеномное секвенирование человека (русского, мужчины) с использованием двух современных технологий секвенирования ДНК – циклического лигазного секвениро-

вания технологии SOLiD (Applied Biosystems) и технологии секвенирования на молекулярных кластерах с использованием флуоресцентно меченных предшественников (Illumina). Настоящая работа посвящена оптимизации алгоритмов получения, анализа и представления данных полногеномного секвенирования.

Прежде чем приступить к описанию основных результатов и методик их получения, кратко будут изложены принципы и термины технологии крупномасштабного секвенирования, т.н. «next generation sequencing». Сначала геномная ДНК фрагментируется до размеров 200–1000 п.н. Полученные фрагменты представляют собой основу для создания библиотеки случайных фрагментов (далее по тексту *shotgun*), что достигается путем последовательных ферментативных реакций, пришивки олигонуклеотидных адаптеров с последующей амплификацией в ПЦР. Технологии создания библиотек для платформы GAII и SOLiD описаны на сайтах производителей. Дальнейшие процедуры связаны с получением первичной нуклеотидной последовательности с каждого из двух концов участка ДНК, представленного в библиотеке. Такие последовательности ДНК называют «чтениями» (по аналогии с общепринятым в англоязычной литературе термином «read»). Длина чтений различается для двух платформ и составляет 36 нуклеотидов для GAII и 25 нуклеотидов для SOLiD. Таким образом, каждый фрагмент ДНК в составе библиотеки характеризуется двумя чтениями с длиной и направлением, зависящим от использованной технологической платформы. Затем чтения, полученные в результате секвенирования фрагментов *shotgun* библиотек с двух концов (парноконцевое чтение), располагаются на референсном геноме человека hg18. Этот процесс называется «картирование чтений», в результате которого каждому чтению приписывают координаты его местоположения. Картирование позволяет построить гистограммы покрытия генома, гистограммы расстояния между парными чтениями, найти однонуклеотидные полиморфизмы (ОП) и короткие инсерции/делеции. Более того, расстояния между чтениями и их ориентация служат важной информацией для оценки более существенных структурных перестроек исследуемого генома. Так, если расстояние между картированными чтениями будет существенно превышать физический размер фрагментов ДНК, использованных для создания библиотеки, то это будет означать делецию в анализируемом геноме по сравнению с референсным, произошедшую между этими чтениями. Аналогично, если чтения имеют аномальную ориентацию, противоречащую логике создания библиотек, то это может говорить о возможных инверсиях в рассматриваемом районе. Таким образом, широкомасштабное секвенирование с использованием новых технологий позволяет определять как короткие полиморфные районы, так и указывать на возможные крупные генетические аномалии. Однако последние могут быть точно описаны только в результате *de novo* сборки чтений в протяженный контиги, что выходит за рамки задач представленной работы.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Выбор образца ДНК.** Выбор человека, геном которого должен был быть секвенирован, происходил на основе результатов анализа этнических групп Российской Федерации

методом основных компонент (далее PCA, от англ. Principal Component Analysis). Одна тысяча триста восемьдесят два человека, представляющих 32 этнические группы, были генотипированы по не менее чем 300 000 аутосомным ОП с помощью высокоплотных микроматриц ДНК. Группа этнических русских состояла из 285 образцов, которые были предоставлены профессором Заридзе Д.Г. Человек, геном которого был выбран для секвенирования, характеризовался основными компонентами, которые располагали его на двумерной карте в координатах первой и второй основной компоненты (PC1-PC2) внутри группы этнических русских. При этом эта область PC1-PC2 пространства не пересекалась ни с одной другой областью других близкородственных этнических групп (статья в процессе подготовки к печати).

**Подготовка образцов.** Геномная ДНК была выделена из артериальной крови (белых кровяных телец) русского мужчины (пациент N Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН, страдающий раком почки, см. выше). Фрагментирование ДНК проводилось на приборе HydroShear® (Genomic Solutions®, США) до среднего размера фрагментов 500–1000 п.н. Приготовление геномных библиотек и все последующие манипуляции были проведены в соответствии с рекомендациями фирм – производителей оборудования и соответствующих наборов реактивов. Обе геномные библиотеки были пригодны для чтения фрагментов с двух концов. Геномная библиотека, приготовленная для использования на секвенаторах Genome\_Analyser\_II (Illumina, США) (далее GAII), после стадии лигирования адаптеров была разделена на части: одна часть была заморожена, а другая была использована для проведения ПЦР (в дальнейшем данные этого этапа упоминаются как «амплификация № 1»). После секвенирования этой библиотеки в 9 проточных ячейках была разморожена вторая аликвота, и с ней также была проведена ПЦР. Эти образцы были использованы для секвенирования в 5 проточных ячейках (стадия «амплификация № 2»).

Эта же фрагментированная ДНК была вовлечена в создание геномных библиотек, пригодных для парного чтения на приборах SOLiD v2 (Applied Biosystems, США) (далее по тексту SOLiD). После проведения ПЦР в водно-масляной эмульсии реакционная смесь (ДНК, прикрепленная к магнитным шарикам) была нанесена на проточные ячейки, где и проходила лигазная цепная реакция. В каждом цикле секвенирования фермент (лигаза) пришивал к 5'-концу субстратного комплекса флуоресцентно меченный олигонуклеотид. После идентификации флуоресцентной метки проводилось ее отщепление и регенерация субстратного комплекса, удлинённого на 5 нуклеотидов. Всего было секвенировано 9 проточных ячеек.

**Секвенирование.** Для расшифровки генетической информации использовались две технологические платформы, разработанные компаниями Illumina и Applied Biosystems.

Первая платформа использует метод детекции флуоресцентных сигналов меченых нуклеотидов, включающихся в процессе синтеза *in situ* в состав поверхностных молекулярных кластеров. Данная технология реализована на секвенаторах GAII (Illumina, США). Длина чтения на этом приборе составляла по 36 нуклеотидов с каждого конца, и всего было использовано 14 проточных ячеек. Вто-

рая платформа базируется на технологии лигазного секвенирования и реализована в приборе SOLiD. Длина чтения на этом приборе составляла по 25 нуклеотидов с каждого конца, и было использовано 9 проточных ячеек.

**Генотипирование** нефрагментированной геномной ДНК проводилось с использованием технологии Infinium на микроматрицах 610quad (Illumina), согласно рекомендациям производителя. Сканирование микроматрицы было проведено с использованием конфокального сканера iScan. Контроль качества процедуры показал высокую степень соответствия контрольным параметрам (call rate 99.7 %). Всего были достоверно выявлены аллельные варианты 588 702 однонуклеотидных полиморфизмов (далее ОП). Их список представлен на сайте производителя [http://www.illumina.com/documents/products/marker\\_lists/marker\\_list\\_human660W\\_quad.zip](http://www.illumina.com/documents/products/marker_lists/marker_list_human660W_quad.zip).

**Анализ данных GAI.** Для анализа полученных изображений и их конвертации в последовательности ДНК использовался программный пакет Illumina Genome Analyzer Pipeline версии 1.4.0. Картирование последовательностей на референсный геном (hg18) было осуществлено с помощью программ Eland (входящей в Genome Analyzer Pipeline) и SOAPaligner/soap2 версии 2.20, разработанной в Пекинском Институте геномики (<http://soap.genomics.org.cn/>) (далее SOAP). Полученная библиотека парно-концевых чтений с использованием платформы GAI, доступная для загрузки на персональный компьютер, находится на сайте проекта <http://www.russiangenome.ru>. Данная библиотека позволяет просматривать локализацию чтений и их направление в доступных геномных браузерах, таких как UCSC Genome browser или Ensembl Genome Browser. Для вычисления нуклеотидных несовпадений и коротких инсерций/делеций относительно референсного генома использовался SOAPaligner/soap2.

**Анализ данных SOLiD.** Подготовка данных SOLiD к картированию велась на программных пакетах, поставляющихся в комплекте с прибором. Картирование последовательностей осуществлялось в оригинальном цветовом пространстве с помощью программного пакета SOLiD System Analysis Pipeline Tool (Corona Lite) версии 4.0r2.0, а также, после конвертирования последовательностей из цветового пространства в формат FASTQ, программой Burrows-Wheeler Aligner (BWA) версии 0.5.1 на кластере в РИЦ «Курчатовский институт». В зависимости от сложности задачи в вычисления было вовлечено от 20 до 250 ядер. Все расчеты и для GAI, и для SOLiD данных, кроме BWA, проводились на выделенном компьютере при вычислительном кластере РИЦ «Курчатовский институт». Аналогично данным с GAI данные SOLiD можно просматривать в геномных браузерах с сайта проекта <http://www.russiangenome.ru>.

**Оригинальные методы анализа.** Для расчета гистограмм плотности покрытия и расстояний между чтениями в парно-концевых библиотеках, а также для расчета ошибок секвенирования по сравнению с результатами генотипирования на микроматрицах ДНК однонуклеотидных полиморфизмов использовались коды, написанные авторами на языке Perl. Коды могут быть предоставлены по запросу.

Таблица 1. Общая статистика проведенного анализа. Проценты указаны в отношении общего числа чтений отдельно для GAI (оранжевый фонный цвет) и SOLiD (голубой фонный цвет)

		GAI (SOAP)	SOLiD (CoronaLite)
Всего нуклеотидов		60 290 962 560	48 151 787 550
Всего чтений		1 674 748 960	1 926 071 502
Всего неоткартированных		17.41 %	32.65 %
Всего одиночных		13.99 %	48.53 %
Уникальных		5.75 %	31.36 %
Множественных		8.24 %	17.17 %
Ошибки при картировании	0	54.85 %	55.67 %
	1	16.95 %	23.13 %
	2	28.20 %	21.20 %
Всего парных		68.60 %	18.82 %
Уникальных		51.16 %	12.20 %
Множественных		17.44 %	6.62 %
Ошибки при картировании	0	74.29 %	28.14 %
	1	16.32 %	21.86 %
	2	9.39 %	50.00 %
		SOAP	CoronaLite
Инсерции	Всего	0.93 %	—
	1 п.н.	0.58 %	—
	2 п.н.	0.19 %	—
	3 п.н.	0.08 %	—
	4 п.н.	0.08 %	—
Делеции	Всего	0.81 %	—
	1 п.н.	0.50 %	—
	2 п.н.	0.17 %	—
	3 п.н.	0.07 %	—
	4 п.н.	0.07 %	—

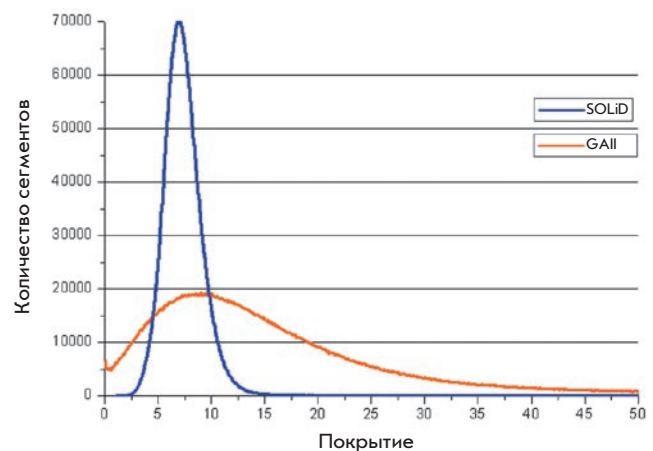
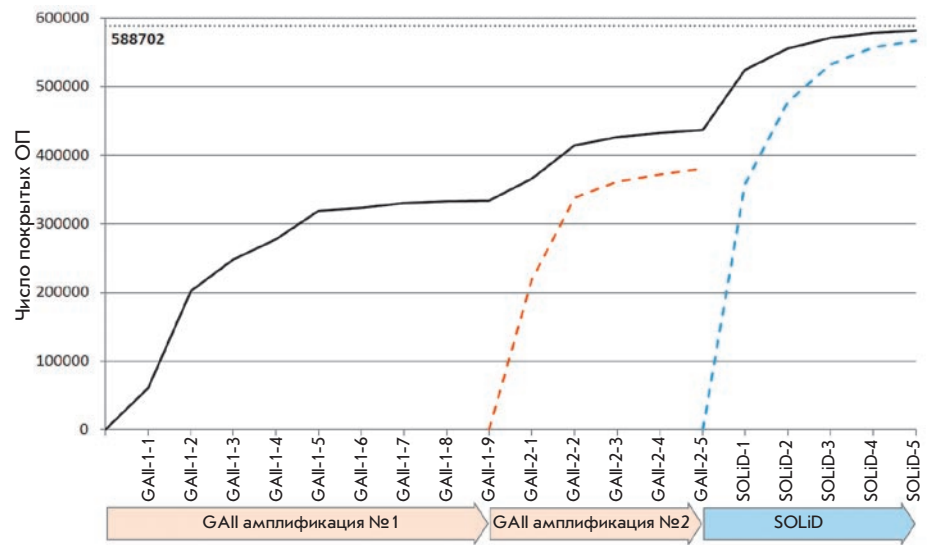


Рис. 1. График плотности покрытия генома mRG-1. Оранжевым и голубым цветами отмечены графики для GAI и SOLiD соответственно

Рис. 2. График наполнения генотипированных на микроматрице ДНК однонуклеотидных полиморфизмов данными по секвенированию генома. Из данных картирования (Eland для GAI, BWA для SOLiD) определялось, какое количество ОП хотя бы раз попало под картированное чтение. Каждый шаг по оси X соответствует получению данных с одной проточной ячейки. Общее количество генотипированных ОП указано горизонтальной асимптотой на уровне 588 702. График наполнения по секвенированию только «амплификации № 2» показан оранжевой пунктирной линией. График наполнения по секвенированию только на SOLiD показан синей пунктирной линией



**РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**АНАЛИЗ ДАННЫХ, ПОЛУЧЕННЫХ НА ПЛАТФОРМЕ GAI и SOLiD**

Общий объем генетических данных от геномной библиотеки «амплификации № 1» и «амплификации № 2», прошедших внутренние аппаратные контроли (base pairs passed filters), составил 60.2 млрд нуклеотидов или 1 674 748 960 чтений для GAI и 48.1 млрд нуклеотидов или 1 926 071 502 чтений для SOLiD. Картирование чтений на референсный геном человека позволило построить график плотности заполнения генома чтениями (рис. 1). Для его построения геном разбивался на последовательные фрагменты длиной 500 п.о., затем из данных картирования (Eland для GAI и BWA для SOLiD) вычислялось количество чтений, приходящихся на каждый такой фрагмент. Для вычисления плотности покрытия это число умножалось на длину чтения (36 для GAI и 25 для SOLiD) и нормировалось на 500. Оказалось, что для данных, полученных на GAI, такой график имеет форму распределения Максвелла с пиком на 8-кратном покрытии. Следует отметить, что хвост распределения смещается до значений покрытия, равных десяткам тысяч. Такие аномально плотно покрытые последовательности в основном представляли собой центромерные районы. Анализ понуклеотидного покрытия показал, что данные, полученные на платформе GAI, покрывают хотя бы один раз 66.03 % генома или 2 033 881 571 нуклеотид. Общую статистику картирования чтений можно найти в табл. 1. Следует отметить, что количество некартированных на геном чтений в данных SOLiD почти в два раза превышает аналогичное значение для GAI и составляет 32.65 %.

Подсчет количества нуклеотидных несовпадений и коротких инсерций и делеций был проведен только для уникальных выравниваний. Уникальными считаются те выравнивания, которые картируются в референсном геноме лишь один раз, что приписывает им уникальные координаты. Так, из 1.67 млрд чтений около 82.6 % нашло соответствие с минимальными искажениями в референсном

геноме. Оставшиеся 17.4 % были отнесены к классу некартированных чтений. Выборочная проверка случайных 164 чтений из этой категории показала, что ни один из них не может быть картирован на референсный геном с минимальными искажениями (до 2 несовпадений, инсерции/делеции не длиннее 4 нуклеотидов). Всего 13 чтений из 164 были отнесены к другим геномам, в основном к геному обезьян, 2 чтения к геному *Mus musculus* и по одному к геному *Danio rerio* и *E.coli*. Все эти фрагменты имели, однако, не 100 %-ное совпадение с последовательностями ДНК указанных организмов. Основная часть некартированных чтений имела короткое (до 25 нуклеотидов), но полное совпадение с различными участками генома человека.

Проверка совпадений между аллельными вариантами ОП, определенных с помощью секвенирования и генотипирования на микроматрицах ДНК.

С помощью микроматриц ДНК в исследованном геноме были определены аллельные варианты 588 702 ОП с фиксированными координатами. Для того чтобы установить, с какой точностью метод секвенирования может определять ОП, были найдены все чтения, координаты которых включали в себя координаты ОП, выявленных с помощью микроматрицы (далее эти полиморфизмы обозначаются как мОП). Количество ОП, на которые хотя бы раз картировалось чтение на платформах GAI и SOLiD, составило 581 596, или 98.8 % общего количества мОП. Чтения, полученные от платформы GAI, включали 437 056 ОП (74.2 % мОП), а от SOLiD – 566 952 (96.3 %). При секвенировании геномных библиотек, полученных на стадиях «амплификация № 1» и «амплификация № 2» на платформе GAI, удалось получить чтения, пересекающиеся с 333 647 (56.7 %) и 372 483 (55.6 %) мОП соответственно (рис. 2). Для оценки точности предсказания аллельных вариантов с помощью секвенирования были выбраны лишь гомозиготные мОП, число которых, по данным генотипирования, составило 409 760. Также были выбраны только те мОП, на которые картировалось не менее 1, 5 или 10 чтений. В табл. 2 в соответствующих строках «тест на покрытие ≥ 1», «тест на покрытие ≥ 5» и «тест на покрытие ≥ 10» приведено их

Таблица 2. Статистика совпадения предсказания гомозиготных ОП с помощью секвенирования в сравнении с генотипированием

		GAI (Eland)	SOLiD (BWA)	Обе платформы (Eland ИЛИ BWA)
Всего гомозиготных ОП на микроматрице		409 760		
Прохождение тестов	Покрытие ( $\geq 1$ )	302 919	394 373	404 564
	Покрытие ( $\geq 5$ )	250 353	238 130	349 309
	Покрытие ( $\geq 10$ )	194 016	74 902	270 890
		После прохождения всех тестов		
При покрытии $\geq 5$	Количество	242 201	218 974	331 873
	Доля	96.74 %	91.96 %	95.01 %
При покрытии $\geq 10$	Количество	188 708	71 999	261 537
	Доля	97.26 %	96.12 %	96.55 %

количество. В той же таблице представлены доли мОП, значения аллельных вариантов которых для разных платформ и разной глубины покрытия совпадают с предсказанным генотипированием на микроматрице ДНК. В результате анализа установлено, что с помощью секвенирования удастся определить около 81 % мОП с точностью не менее 95 % (табл. 2, серый столбец «Eland или BWA», при покрытии  $\geq 5$ ).

### АНАЛИЗ ИНФОРМАЦИИ О ВЗАИМНОМ РАСПОЛОЖЕНИИ ПАРНО-КОНЦЕВЫХ ЧТЕНИЙ

Для оценки количества структурных перестроек, произошедших в исследуемом геноме, была использована информация о взаимном расположении на референсном геноме парно-концевых чтений. На рис. 3 приведен график зависимости количества картированных на hg18 парных чтений от длины референсной последовательности, находящейся между ними. Как видно из рис. 3, форма графика для двух платформ существенно различается, что может отражать принципиальную разницу в протоколах приготовления геномных библиотек, предназначенных для парно-концевого чтения. Следует обратить внимание на форму распределения расстояний между парными чтениями: графики для платформы GAI имеют локальные пики, расположенные в значениях 70 п.о. и 300 п.о., а также высокий пик в районе 700 п.о. Скорее всего, это связано с чтениями, попадающими на повторяющиеся элементы, которые имеют дискретные длины в указанных районах. Такая ситуация уже описывалась выше как проблема ELAND при анализе гистограммы покрытия. График распределения расстояний между чтениями в геномной библиотеке для платформы SOLiD имеет один пик в районе 1000 п.о.

В работе были также проанализированы возможные варианты (3) взаимного расположения и направления парных чтений. Первый вариант – чтения картируются на референсный геном в соответствии с логикой приготовления библиотеки. Для платформы GAI это означает, что два чтения ориентированы навстречу друг другу, если под на-

правлением принять 5'–3' ориентацию. Для платформы SOLiD взаимное расположение чтений на референсном геноме соответствует логике приготовления библиотеки, если они сонаправлены. Второй и третий варианты – это отличия от «нормального» расположения, возможные в том случае, если исследуемый геном имеет существенные перестройки в рассматриваемом районе, что приводит к тому, что одно или оба чтения будут картироваться на референсный геном с одной или с двумя инверсиями. В соответствии с этими определениями все парные чтения были отнесены к трем классам: «нормальные», «с одной инверсией» и «с двумя инверсиями» (табл. 3). Те чтения, которые картируются на разные хромосомы референсного генома, выделены в отдельный класс. Небольшой избыток чтений, картируемых на разные хромосомы, в случае SOLiD объясняется присутствием этапа лигирования тупых концов фрагментов и двуцепочечных олигонуклеотидов, что потенциально создает возможность ковалентного соединения двух фрагментов с разных хромосом. В целом, процент аномально ориентированных чтений приблизительно одинаков у двух платформ.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ВЫВОДЫ

Нами проведено полногеномное секвенирование человека, этнически принадлежащего к русским. Основной особенностью этой работы является факт комбинирования двух технологических платформ – GAI и SOLiD. Сравнительная производительность двух систем, следует отметить, что генерация данных заняла приблизительно одинаковое количество времени, а именно 8 недель. За это время было сделано 14 запусков (по одной проточной ячейке) секвенаторов GAI и 5 запусков (по 2 проточных ячейки) SOLiD. Это позволило получить соответственно 60.2 и 48.1 млрд нуклеотидов. Во время производства работ все основные параметры функционирования технологических платформ находились в пределах, декларируемых производителями как номинальные. Анализ данных был проведен на компьютерном кластере Курчатовского научного центра, куда

данные с секвенаторов передавались по высокоскоростному оптическому каналу, что потребовало создания программного обеспечения по проверке в режиме реального времени сохранности переданных файлов. Анализ первичных данных занял приблизительно 10 недель.

Основное отличие между данными платформ GAI и SOLiD проявляется в том, насколько равномерно покрывают исследуемый геном производимые секвенаторами чтения. По нашим оценкам, чтения GAI покрывают около 75 % генома, а SOLiD – 95 %, и это несмотря на то, что GAI произвел больше нуклеотидов, чем SOLiD. Та же самая тенденция прослеживается и при анализе графика плотности покрытия генома (рис. 1). Значение графика плотности для данных SOLiD в пиковой точке в несколько раз превышает максимальное значение пика для данных GAI. Однако уже при покрытии более 20 данные SOLiD (синий график) практически не обнаруживают таких последовательностей, в то время как данные GAI (оранжевый график) показывают наличие около 10 000 таких плотно покрытых фрагментов. Таким образом, чтения, произведенные платформой SOLiD, покрывают референсный геном существенно более равномерно, чем чтения платформы GAI. Это обстоятельство отражает качество приготовления shotgun библиотек. Тот факт, что для получения равномерного покрытия на платформе GAI необходимо приготовление нескольких библиотек, желательно с различной длиной фрагментов, был отмечен в работах других авторов, в частности при секвенировании генома корейца [7]. Более того, секвенирование даже двух разных ПЦП амплификаций одних и тех же первичных фрагментов, полученных на предварительной стадии создания библиотеки, приводит к тому, что охватываются пусть и сильно пересекающиеся, но все же неидентичные части исследуемого генома. Так, при «амплификации № 1» после 9 запусков прибора GAI график наполнения мОП чтениями выходит на насыщение (рис. 2). После проведения независимой «амплификации № 2» происходит скачок графика наполнения, который, однако, после пяти запусков секвенатора тоже выходит на насыщение. Таким образом, проведение дополнительных запусков с библиотеками «амплификация № 1» и «амплификация № 2» не привело бы к существенному

Таблица 3. Статистика анализа распределения парных чтений. Под инверсией подразумевается изменение направления одного из парно-концевых чтений на референсном геноме по сравнению с расчетным. Под двойной инверсией – изменение направления сразу двух чтений. Данные по GAI и по SOLiD выделены фоновым оранжевым и голубым цветами

		GAI	SOLiD
Парный фрагмент картируется на другую хромосому		3.18 %	4.56 %
Взаимное расположение парных ридов	Нормальное	96.12 %	95.22 %
	Подразумевает инверсию	0.48 %	0.14 %
	Подразумевает двойную инверсию	0.22 %	0.07 %
Размер вставки находится в допустимом диапазоне		93.06 %	95.43 %

увеличению покрытия генома. Добавление к данным GAI данных SOLiD решило проблему частичного покрытия генома. Мы предполагаем, что эта проблема также могла быть решена за счет создания дополнительной библиотеки для GAI, с иным средним размером фрагментов.

Точность секвенирования была оценена за счет сравнения данных аллельных вариантов гомозиготных ОП, определенных с помощью секвенирования и генотипирования на микроматрице ДНК. Оказалось, что при покрытии ОП минимум 10 чтениями ошибка определения значения ОП приблизительно одинакова у двух платформ и колеблется в районе 4–5 %. Однако по причине равномерной, но недостаточной глубины покрытия генома чтениями SOLiD количество таких надежно определенных гомозиготных ОП в несколько раз меньше у SOLiD, чем у GAI.

Полученные результаты позволяют в будущем провести определение всех ОП данного генома, сделать т.н. SNP calling и сравнить аллельные варианты ОП, предсказанные GAI и SOLiD. Анализ данных ОП с фиксированными коор-

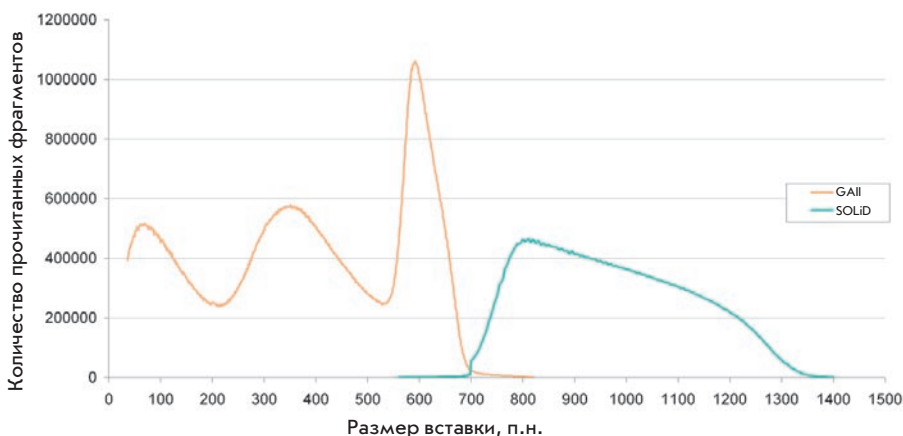


Рис. 3. График распределения расстояний между парными чтениями для библиотек, анализированных на GAI (оранжевая линия) и SOLiD (голубая линия). Чтения картировались на референсный геном человека hg18 (Eland для GAI, Corona Lite для SOLiD), после чего рассчитывалось гипотетическое расстояние между парными чтениями, определенное с помощью референсного генома. Количество фрагментов (по оси Y) было сопоставлено с предсказываемой длиной (по оси X)

динамами, аллельные варианты которых были определены секвенированием и генотипированием на микроматрице ДНК, показывает, что такие результаты во многом должны иметь высокую предсказательную силу и пересекаться не менее чем на 95 %. Более того, безусловный интерес представляет сравнение всех полиморфизмов исследуемого генома с уже известными геномами, в частности Крэйга Вентера и Джэймса Уотсона. Вторым возможным направлением работы является проведение *de novo* сборки протяженных фрагментов из тех чтений, которые не картировались на референсный геном. Потенциально они могут указывать на участки ДНК, непредставленные в референсном геноме hg18, и, тем самым, являться отличительной особенностью исследуемого нами генома.

Наши результаты создают предпосылки для дальнейшего функционального анализа данного генома. В частности, при секвенировании транскриптома знание гетерозиготных ОП в составе экспрессирующихся мРНК в клетках

крови позволит определить те транскрипты, которые имеют сдвиг от биаллельной экспрессии. Такая связь между эпигенетической и генетической составляющей этого генома представляет несомненный интерес для будущих исследований. Однако для этого изучаемый геном должен стать полноценным модельным объектом, что может быть достигнуто за счет иммортализации соматических клеток N и перевода их в линию клеток. Это позволит всем заинтересованным исследователям полноценно использовать информацию, представленную в данной статье. Авторы выражают благодарность Н.В. Равину за внимательное чтение рукописи статьи и важные советы по построению изложения результатов исследования. ●

*Работа была поддержана ФЦП  
«Развитие инфраструктуры наноиндустрии  
в Российской Федерации  
на 2008-2012 годы».*

---

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lander E., Linton L., Birren B., Nusbaum C., Zody M., et al. // *Nature* 2001. V. 409. P. 860–921.
2. Levy S., Sutton G., Ng P., Feuk L., Halpern A., et al. // *PLoS Biology*. 2007. Sep 4;5(10):e254.
3. Wheeler D., Srinivasan M., Egholm M., Shen Y., Chen L., et al. // *Nature*. 2008. V. 452. P. 872–876.
4. Bentley D., Balasubramanian S., Swerdlow H., Smith G., Milton J., et al. // *Nature*. 2008. V. 456. P. 53–59.
5. McKernan K., Peckham H., Costa G., McLaughlin S., Fu Y., et al. // *Genome Research*. 2009. V. 19. № 9. № 1527–1541.
6. Wang J., Wang W., Li R., Li Y., Tian G. // *Nature*. 2008. V. 456. P. 60 – 65.
7. Ahn S., Kim T., Lee S., Kim D., Ghang H., et al. // *Genome Research*. 2009. V. 19. № 9. P. 1622–1629.
8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/genomes/>

УДК 576.3:616-006.446

# Клеточная регуляция пролиферации и дифференцировки *ex vivo* клеток, содержащих Ph хромосому, при хроническом миелолейкозе

Н.И. Гринева\*, Т.В. Ахлынина, Л.П. Герасимова, Т.Е. Манакова, Т.Г. Сарычева, Д.А. Шмаров, А.М. Тимофеев, Н.М. Найденова, Л.Ю. Колосова, Т.И. Колошейнова, Л.Г. Ковалева, С.В. Кузнецов, А.В. Воронцова, А.Г. Туркина

Гематологический научный центр Российской академии медицинских наук, Москва, 125167, Новый Зыковский пр-д, 4а

\*E-mail: nigrin27@mail.ru

**РЕФЕРАТ** Обнаружена и изучена регуляция пролиферации и дифференцировки Ph<sup>+</sup>клеток от разных больных хроническим миелолейкозом (ХМЛ) *ex vivo*. Регуляция осуществляется при чередовании эффективных этапов пролиферации и созревания с ингибированием пролиферации Ph<sup>+</sup>клеток накапливающимися нейтрофилами при блокировании апоптоза. Чередование этапов состоит в переключении этапа 1 – эффективной пролиферации на этап 2 – эффективного созревания и протекает по схемам: 1/2–1/2/1 или 2/1–2/1/2/1. Кинетические кривые чередований проходят контрольные точки пересечения кривых, в которых показатели этапов пролиферации и созревания одинаковы. Индексы эффективности P/D равны  $1.06 \pm 0.23$ , они не зависят от времени, порядка чередования и от источников Ph<sup>+</sup>клеток – больных ХМЛ. На этапах пролиферации повышено содержание пролиферирующих клеток, понижено содержание нейтрофилов и индуцирован апоптоз. На этапах созревания, напротив, апоптоз блокирован, повышено содержание нейтрофилов и понижено содержание незрелых. При этом нейтрофилы в повышенной концентрации ингибируют пролиферацию Ph<sup>+</sup>клеток и нарушают свое созревание инверсией порядка созревания нейтрофилов, вероятно, по механизму обратной связи. Различия в регуляции выявляют три типа Ph<sup>+</sup>клеток больных ХМЛ, которые отличаются числом и продолжительностью этапов чередования. Ph<sup>+</sup>клетки 1-го и 2-го типов характеризуются одним длительным этапом эффективной пролиферации или эффективного созревания с индексами эффективности P/D<sup>1</sup> = 1–20 или P/D<sup>2</sup> ≤ 1. Для Ph<sup>+</sup>клеток 3-го типа за тот же период чередование этапов протекает неоднократно с P/D<sup>1</sup> = 1–4 или P/D<sup>2</sup> ≤ 1. Ph<sup>+</sup>клетки 1-го типа (~ 20 %) выделены от больных в прогрессирующих стадиях ХМЛ, Ph<sup>+</sup>клетки 2-го и 3-го типов (~ 30 и 50 %) – от больных в хронической фазе ХМЛ с положительной реакцией на химиотерапию ХМЛ.

**Ключевые слова:** регуляция пролиферации и дифференцировки Ph<sup>+</sup>клеток зрелыми нейтрофилами, культивирование гемопоэтических Ph<sup>+</sup>моноклеаров, кинетика пролиферации и дифференцировки Ph<sup>+</sup>клеток *in vitro*, апоптоз Ph<sup>+</sup>клеток, распределение Ph<sup>+</sup>клеток в фазах клеточного цикла, эффективность пролиферации и дифференцировки Ph<sup>+</sup>клеток, инверсия порядка накопления созревающих нейтрофилов, хронический миелолейкоз.

**Список сокращений:** ПД – пролиферация и дифференцировка; ХМЛ – хронический миелолейкоз; Ph – Филадельфийская хромосома; СЯ, ПЯ, ММ – нейтрофилы сегментоядерные, палочкоядерные и метамиелоциты; Ph<sup>+</sup>клетки – гемопоэтические (кроветворные) клетки, содержащие Филадельфийскую хромосому; ПК – периферическая кровь; КМ – костный мозг; ХФ, ФА, БК – хроническая фаза, фаза акселерации и бластный криз ХМЛ; ЭТС – эмбриональная сыворотка теленка.

## ВВЕДЕНИЕ

Лейкозы составляют 1 % всех причин смертности населения и 4–10 % смертности от злокачественных новообразований. Встречаемость лейкозов и лимфом колеблется от 3 до 9 на 100 тыс. населения и сильно зависит от стран и регионов. При неблагоприятной радиационной обстановке и экологии их встречаемость возрастает на полтора порядка. В США лейкозы являются основной причиной смерти детей до 15 лет.

Большинство лейкозов является результатом генетических перестроек: хромосомных аномалий, транслокаций, инверсий, делеций и многочисленных мутаций в процессе болезни [1–3, 6]

Клетки, содержащие Филадельфийскую хромосому (Ph<sup>+</sup>клетки) и экспрессирующие активную тирозинкиназу p210 или p185 (онкобелки, кодируемые геном *bcr/abl*), участвуют в патогенезе хронического миелолейкоза (ХМЛ). Хромосомная транслокация *t(9;22)(q34;q11)* протекает в гемопоэтической (кроветворной) полипотентной стволовой клетке с образованием Ph хромосомы и онкогена *bcr/abl* в ее составе. Деление и дифференцировка этой клетки – моноклональный процесс – ведет к замене нормальных гемопоэтических клеток Ph<sup>+</sup>клетками и способствует возникновению и прогрессии ХМЛ [1–8, 10, 12].

По диагностике и отношению к терапии течение ХМЛ у разных больных различается. Клеточные и молекуляр-



ные механизмы этих различий у больных ХМЛ не изучены. Представления о течении и прогрессировании ХМЛ *in vivo* составлены усреднением результатов многих анализов многочисленных параметров в отдельные моменты большого числа больных в разных фазах ХМЛ. ХМЛ протекает через хроническую фазу (ХФ), фазу акселерации (ФА) и острую, быстротечную фазу бластного криза (БК) с летальным исходом. В настоящее время в терапии лейкозов применяются высокоспецифичные (таргетные) препараты, блокирующие агрессивную тирозинкиназу p210, – иманитиб и его аналоги. Иманитиб увеличивает 6-летнюю выживаемость у 88 % пациентов. Из них 66 % продолжают принимать препарат, у 14 % ХМЛ продолжает прогрессировать, и 5 % больных прерывают лечение из-за токсичности препаратов. При этом наблюдаются новые мутации *bcr/abl* онкогена, которые ведут к резистентности при терапии и, хотя созданы новые поколения специфичных к тирозинкиназе препаратов, проблема остается, т.к. ни один из них не уничтожает покоящихся лейкозных стволовых клеток. Менее 5 % пациентов в ХФ ХМЛ излечивается, у остальных возникают рефрактерные рецидивы ХМЛ [6]. В связи с этим необходимы новые подходы выбора препаратов, действующих на лейкозные стволовые клетки.

Несмотря на многочисленные исследования гемопоэтических клеток, содержащих Ph хромосому и участвующих в патологии ХМЛ, в культурах и *in vivo* [4, 5, 7–12, 15–20, 23, 27], многое остается неясным в процессах, протекающих в первичных Ph<sup>+</sup> клетках от больных ХМЛ и при прогрессии ХМЛ. Отсутствует единая концепция биологических и молекулярных процессов при ХМЛ *in vitro* и *in vivo* и их связи между собой. Мало известно о закономерностях пролиферации и дифференцировки (ПД) Ph<sup>+</sup> клеток даже *in vitro*.

Неоднократно отмечались противоречия в процессах на клетках ХМЛ *ex vivo* по сравнению с клеточными линиями. При ХМЛ гемопоэтических пролиферирующих незрелых клеток образуется меньше, а нейтрофилов, созревающих без деления, больше, чем в норме [13, 14, 20–23, 26]. Стволовые Ph<sup>+</sup> клетки пролиферируют менее активно, чем стволовые клетки доноров, а более зрелые Ph<sup>+</sup> клетки накапливаются, наоборот, более активно [20, 23, 24, 27]. На этом основании предполагается, что причиной ХМЛ служит дисбаланс самоподдержания (self-renewal) стволовых клеток и пролиферации миелоидных клеток-предшественников с созреванием их поздних потомков, а не пролиферация Ph<sup>+</sup> клеток под действием тирозинкиназы p210 *bcr/abl*, как это следует из многих других работ [4–7, 10–12, 15, 16, 19, 24–29, 31].

Отметим, что представления о блокировании апоптоза в Ph<sup>+</sup> клетках также неоднозначны. Очевидно, что не все особенности клеточной и молекулярной регуляции Ph<sup>+</sup> клеток при ХМЛ ясны, хотя способность онкогена *bcr/abl*, кодирующего тирозинкиназу p210, определять туморогенные свойства, повышать жизнеспособность клеток, активировать в линиях Ph<sup>+</sup> клеток пролиферацию и блокировать апоптоз детально изучалась [7, 4, 17, 18, 25–27, 29, 30, 35, 43–45].

В работе [27] исследована роль разных мутантов p210 в клеточной пролиферации, туморогенности и апоптозе Ph<sup>+</sup> клеток, полученных трансфекцией генно-инженерными

конструкциями с различными мутациями в онкогене *bcr/abl*. Показано, что функции p210 в активации пролиферации клеток и ингибирования апоптоза проявляются отдельно и обязаны разным мутациям в *bcr/abl*, в т.ч. отвечающим за изменения путей сигнальной трансдукции с участием разных СТАТ белков. Предполагается, что соотношение активации пролиферации и блокирования апоптоза и их баланс могут смещаться в разных направлениях и в разной степени в зависимости от мутаций в онкогене *bcr/abl*. Для Ph<sup>+</sup> клеток от больных ХМЛ такие свойства не изучены по причине отсутствия удобных моделей и подходов, хотя мутации в гене *bcr/abl* активно исследуются и используются для диагностики и выбора терапии при ХМЛ [19, 29, 30–32]. На основании изложенного мы предположили, что кинетика пролиферации и дифференцировки (ПД) Ph<sup>+</sup> клеток может обнаружить различия в регуляции ПД Ph<sup>+</sup> клеток индивидуальных больных ХМЛ *ex vivo*.

Целью данной работы являлось изучение механизма ПД *ex vivo* Ph<sup>+</sup> клеток от индивидуальных больных ХМЛ в суспензионной культуре с помощью разработанного нами ранее кинетического подхода к исследованию ПД Ph<sup>+</sup> клеток [33, 39]. При этом Ph<sup>+</sup> клетки от ХМЛ в культуре пролиферируют и дифференцируются аналогично схеме усиленного миелопоэза ХМЛ (кроветворения миелоидного отдела клеток) *in vivo* и для ПД можно определить эффективность ПД, влияние ростовых факторов, экспрессию гена *bcr/abl* и экспрессию дифференцировочных антигенов Ph<sup>+</sup> клеток.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

*Использованы материалы:* гепарин (Flow, Англия); Lymphoprep, среда альфа-MEM (MP Biomedical, США); DEFC, Heres, Трис, PBS, эмбриональная бычья сыворотка (ЭБС), цитрат Na, лаурилсаркозил (ICN, США); краситель трипановый синий, L-глутамин и 2-меркаптоэтанол (Serva, Германия), пенициллин и стрептомицин (ОАО «Биохимик», Саранск, Россия); Г-КСФ (F.Hoffmann-La Roche Ltd, Франция); PBS (10мМ фосфатный буфер + 0.13 M NaCl + 2.7 mM KCl, pH 7.4) таблетированный, НПЦ «Эко-сервис», Россия.

*Исследовали Ph<sup>+</sup> мононуклеары,* выделенные из ПК и КМ от больных ХМЛ в ХФ до лечения и в процессе лечения в ХФ, ФА и БК ХМЛ. При ХМЛ основное содержание мононуклеаров составляют лейкоциты и гранулоциты. Именно они исследовались в работе. Характеристики Ph<sup>+</sup> клеток и больных ХМЛ, из ПК и КМ которых получены мононуклеары, даны в табл. 1–3. В Ph<sup>+</sup> клетках определены типы мРНК *bcr/abl*: b3a2, b2a2 или e1a2 с помощью метода RT-PCR (обратной транскрипционной полимеразной цепной реакции) как указано в [33, 35].

*Ph<sup>+</sup> мононуклеары из ПК и КМ получали,* отбирая 10–15 мл крови из вены или 1–2 мл КМ из заднего гребешка подвздошной кости больного на разных стадиях ХМЛ, во флакон с гепарином (50 ед/мл), наслаивали на Лимфо-преп или фиколл с плотностью 1.077 г/см<sup>3</sup>. Легкую фракцию Ph<sup>+</sup> клеток выделяли центрифугированием (30 мин при 1500 об/мин), дважды промывали буфером PBS, pH 6.8, затем α-MEM средой, суспендировали в α-MEM среде и использовали для анализа и культивирования. Фракция содержала клетки-предшественники (бласты), лимфоциты, гранулоциты и моноциты, а также некоторое количество созревающих нейтрофилов, что характерно для монону-

клеаров ХМЛ. Содержание живых и мертвых клеток анализировали трижды на мазках, окрашенных 0.2 %-ным трипановым синим по Романовскому, с подсчетом клеток в камере Горяева.

*Культивирование Ph<sup>+</sup>клеток* проводили аналогично [33]. 2–8 · 10<sup>6</sup> клеток/мл культивировали в суспензии с α-МЕМ средой, содержащей 10–20 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, 2 mM L-глутамин, 10<sup>-4</sup> M 2-меркаптоэтанол, 100 ед/мл пенициллина и 50 ед/мл стрептомицина, 25 mM HEPES-NaOH), pH 7.2–7.4 в 25 см<sup>2</sup> пластиковом матрасе 2–3 ч, затем неадгезированные клетки центрифугировали 7 мин при 1500 об/мин разбавляли до концентрации [0.8–1.4 · 10<sup>6</sup>] клеток/мл той же средой, переносили в 24- или 96-ячеечные платы по 12 ячеек на каждую пробу и инкубировали при 37 °C в условиях абсолютной влажности и 5 %-ного содержания CO<sub>2</sub> в течение 2 ч без ЭТС. Затем добавляли ЭТС до 10–20 %, и клетки культивировали 6–14 сут, отбирая пробы отдельными ячейками. Ph<sup>+</sup>клетки в пробах отмывали от ЭТС центрифугированием в среде альфа-МЕМ и анализировали их морфологию и состав субпопуляций, распределение в фазах клеточного цикла и апоптоз. Отдельно определили, что 2-часовое выдерживание клеток без ЭТС и последующее культивирование с ЭТС замедляет рост клеток в течение ~ 6 ч. Далее скорость роста клеток восстанавливается, и через 12 ч культивирования состав субпопуляций не отличается от полученного без удаления ЭТС.

*В отбираемых пробах анализировали* число живых и погибших клеток, морфологический состав клеток на мазках в трех зонах по 100 клеток в каждой по методу Романовского и идентифицировали морфологию клеток по Абрамову [34], определяя содержание каждого вида клеток в каждой пробе. Концентрацию клеток в пробах вычисляли по их содержанию в расчете на 10<sup>6</sup> клеток/мл и получали кинетические кривые накопления и расходования субпопуляций Ph<sup>+</sup>лейкоцитов, гранулоцитов, а также суммы пролиферирующих клеток Р (бластов, промиелоцитов и миелоцитов) и суммы нейтрофилов, созревающих без деления, клеток D – метамиелоцитов (ММ), палочкоядерных (ПЯ) и сегментоядерных (СЯ) нейтрофилов. Кривые отражали скорость образования одного вида дифференцирующихся клеток (накопления) с последовательным или параллельным его превращением (расходованием) в следующую субпопуляцию, известную для данной дифференцировки. Средняя ошибка составляла ± 5–11 %. В пробах также анализировали апоптоз и распределение клеток по фазам клеточного цикла с помощью цитофлуориметрии.

*Ph хромосома* в клетках ПК и КМ от больных идентифицирована цитогенетически для 100 митозов или методом FISH в лаборатории кариологии ГНЦ РАМН.

*Цитофлуориметрический анализ кинетических кривых апоптоза и распределения Ph<sup>+</sup>клеток в фазах клеточного цикла при культивировании Ph<sup>+</sup>клеток.*

Пробы Ph<sup>+</sup>клеток (по 5000 клеток) после выделения из КМ и ПК в градиенте плотности фикола и пробы, отобранные в процессе культивирования, центрифугировали 7 мин при 2000 об/мин и 4 °C, промывали буфером PBS и по каплям фиксировали охлажденным 70 %-ным этанолом в течение 30 мин при 4 °C. Перед измерением полученную взвесь промывали PBS, центрифугировали и осадок ин-

кубировали в 0.5 мл PBS, содержащего 5 мкг/мл пропи-дий иодида и 50 мкг/мл рибонуклеазы А, в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте [36, 37]. Измерения проводили в проточном флуориметре EPICS-XL. Клетки гранулоцитарного гейта анализировали с помощью прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния и одновременно регистрировали флуоресценцию FL2 пика по амплитуде и площади импульса (это позволяло отсекалть слившиеся клетки, конгломераты и обрывки клеток) в линейном и логарифмическом масштабе и определяли клетки в апоптозе. К клеткам, вышедшим в апоптоз, относили FL2-Н частицы с гиподиплоидным набором ДНК, располагающиеся в виде пика влево от пика клеток с диплоидным набором ДНК (уменьшение размера клеток не более 2 порядков). Долю гранулоцитов, находящихся в апоптозе, определяли для клеток, анализируемых в гранулоцитарном гейте, где отсутствуют обрывки клеток. В тех же пробах Ph<sup>+</sup>клеток получали ДНК-гистограммы и в них анализировали распределение клеток по фазам клеточного цикла (S, G2/M, G1/0). Для анализа ДНК-гистограмм использована разработанная нами ранее специальная программа компьютерной обработки данных. В основу был положен алгоритм, разработанный для асинхронных пролиферирующих клеточных популяций (SFIT-метод) [38].

*Кинетические кривые пролиферации Ph<sup>+</sup>лейкоцитов* (кривые роста популяции Ph<sup>+</sup>клеток и их гибели) получали согласно доле живых и мертвых клеток, определяемых, как указано выше, и отнесенных к 10<sup>6</sup> клеток/мл. О скорости пролиферации лейкоцитов и гранулоцитов судили по кинетическим кривым их накопления и расходования при культивировании, а также по сумме их субпопуляций, определяемых по морфологии. Кинетические кривые показывали, что параллельно образованию/накоплению клеток соответствующей морфологии протекает превращение их в следующую субпопуляцию. Расходование СЯ нейтрофилов указывало на их гибель.

*Кинетические кривые дифференцировки Ph<sup>+</sup>лейкоцитов и их субпопуляций:* миелоидных клеток, лимфоцитов, гранулоцитов и субпопуляций гранулоцитов: бластов, промиелоцитов, миелоцитов, метамиелоцитов, палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов строили, вычисляя концентрацию соответствующих клеток в пробах и умножением их доли, определяемой по морфологии на мазках, на число клеток × 10<sup>6</sup>/мл. Морфологию на мазках определяли, как указано выше. Состав клеток на мазках анализировали в трех зонах по 100 клеток в каждой. Отметим, что кроме морфологии Ph<sup>+</sup>клетки от ХМЛ № 1.1 и 2.6 идентифицировали по экспрессии антигенов CD с набором моноклональных антител, как указано в работе [39], где приведены результаты идентификации клеток и кинетики по экспрессии антигенов, согласующиеся с данными морфологии [33, 39].

*Кинетические кривые индекса эффективности Р/Д* гранулоцитов при культивировании Ph<sup>+</sup>лейкоцитов определяли как отношение скоростей накопления и расходования суммы пролиферирующих клеток, Р [незрелые] (бласты, промиелоциты, миелоциты), и суммы нейтрофилов, созревающих без деления, D [условно зрелые], получаемые из кинетических кривых Р и D клеток, как указано выше.

Индекс эффективности  $P/D$  определяли как соотношение скоростей накопления клеток  $P$ , пролиферирующих с дифференцировкой (скорость пролиферации), и клеток  $D$ , дифференцирующихся без деления (скорость созревания), эквивалентное соотношению концентрации клеток  $P$  и  $D$  на том основании, что  $V_P/V_D = K_P [P] t / K_D [D] t = K_P / K_D \cdot [P] / [D]$ , где  $V_P$  и  $V_D$  – скорости накопления клеток  $P$  и  $D$ ,  $K_P$  и  $K_D$  – константы скоростей,  $[P]$  и  $[D]$  – концентрации клеток.  $K_P / K_D = K$  – константа удельной эффективности ПД.

**РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Для изучения различий ПД в культуре  $Ph^+$ клеток, выделенных из КМ и ПК больных в разных фазах ХМЛ, были получены кинетические кривые ПД 34 образцов  $Ph^+$ мононуклеаров, выделенных из КМ и ПК 23 больных ХМЛ, при культивировании в строго одинаковых условиях.  $Ph^+$ мононуклеары КМ и ПК содержат кроветворные клетки, способные при ПД в культуре к самоподдержанию (self-renewal – клонированию) и к ПД в течение 2–3 циклов ПД с образованием полного набора  $Ph^+$ клеток [33, 39].

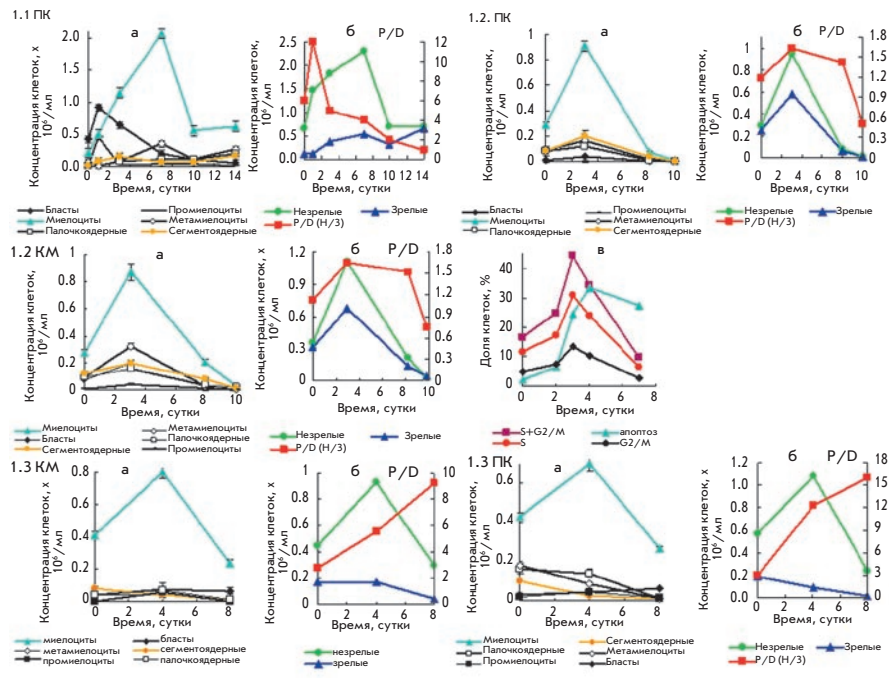


Рис. 1. Кинетические кривые образования и превращения субпопуляций  $Ph^+$ клеток 1-го типа в составе мононуклеаров, выделенных из клеток костного мозга (КМ) и/или периферической крови ПК больных хроническим миелолейкозом (ХМЛ), в суспензионной культуре: а – дифференцировка гранулоцитов с образованием субпопуляций пролиферирующих миелоидных клеток-предшественников (бластов), промиелоцитов, миелоцитов и созревающих без деления нейтрофилов: метамиелоцитов, палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов; б – накопление и расходование пролиферирующих незрелых  $Ph^+$ клеток – клеток  $P$  (суммы пролиферирующих миелоидных клеток-предшественников (бластов), промиелоцитов, миелоцитов) и созревающих без деления нейтрофилов – клеток  $D$  (суммы метамиелоцитов, палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов), а также изменения индекса эффективности  $P/D$  как соотношения скорости пролиферации клеток  $P$  и скорости созревания клеток  $D$ ; в – кривые апоптоза и распределения  $Ph^+$ гранулоцитов по фазам клеточного цикла при культивировании; 1.1 ПК –  $Ph^+$ клетки ПК от ХМЛ № 1.1, хроническая фаза (ХФ) до лечения с быстрой прогрессией ХФ ХМЛ в бластный криз; 1.2 ПК и 1.2 КМ –  $Ph^+$ клетки от ХФ ХМЛ № 1.2; 1.3 КМ и 1.3 ПК –  $Ph^+$ клетки в момент отбора пробы от ХМЛ в фазе акселерации (ФА) в процессе лечения и далее с быстрой прогрессией в бластный криз. Характеристика образцов и показатели пролиферации и дифференцировки  $Ph^+$ клеток 1-го типа приведены в табл. 1

Основную часть  $Ph^+$ мононуклеаров при ХМЛ составляют лейкоциты [1, 7], и поэтому в составе мононуклеаров именно их рассматривали и анализировали в качестве  $Ph^+$ клеток. Субпопуляции лейкоцитов включают миелоидные клетки, гранулоциты, лимфоциты, моноциты; субпопуляции гранулоцитов содержат миелоидные клетки-предшественники (бласты), промиелоциты, миелоциты и нейтрофилы включают: метамиелоциты (ММ), палочкоядерные (ПЯ) и сегментоядерные (СЯ).

Характеристика  $Ph^+$ клеток и их источников – больных ХМЛ даны в табл. 1–3. В пробах клеток по ходу культивирования получены кинетические кривые роста популяции  $Ph^+$ лейкоцитов и их гибели в культуре, их пролиферации, а также кривые дифференцировки субпопуляций  $Ph^+$ гранулоцитов: бластов, промиелоцитов, миелоцитов и нейтрофилов: ММ, ПЯ и СЯ. В тех же пробах получены также кривые апоптоза и распределения  $Ph^+$ клеток в фазах клеточного цикла (рис. 1–4). В опытах наблюдалось повышенное содержание гранулоцитов, характерное для ХМЛ [1, 6, 14]. Характер полученных кривых указывает на скорость образования (накопления) данного вида клеток и их последовательно-параллельные превращения (расходование) с образованием следующей субпопуляции и в конце гибель клеток. Полученные кривые, таким образом, отражают основные процессы дифференцировки (рис. 1–4 и табл. 1–3). Дифференцировка лейкоцитов соответствует известным для ХМЛ данным [1–3, 21, 22, 40–42].

Кроме скорости дифференцировки отдельных субпопуляций (рис. 1–4 а) рассматривались кривые скоростей пролиферации и созревания. В первом случае это кривые накопления клеток  $P$ , дифференцирующихся одновременно с делением и включающих бласты – предшественники миелоидных клеток, промиелоциты, миелоциты. Во втором случае это кривые накопления нейтрофилов, клеток  $D$ , созревающих (дифференцирующихся) без деления и включающих ММ, ПЯ и СЯ клетки (рис. 1–4 б).

Таблица 1. Пролиферация и дифференцировка Ph<sup>+</sup>клеток 1-го и 2-го типов в культуре

№ п/п	Образцы мононуклеаров, выделенных из ПК или КМ больных ХМЛ			Показатели пролиферации и дифференцировки					
	№ образца ПК или КМ ХМЛ	Диагноз, лечение до отбора пробы	Тип <i>bcr/abl</i> РНК. Лейкоциты · 10 <sup>9</sup> / л, % бластов	P/D, [нз]/[з]	Продолжительность этапа P/D, сут	[СЯ]/[Миелоциты]	СЯ · 10 <sup>6</sup> клеток/мл, мах/на сут	Нейтрофилы · 10 <sup>6</sup> клеток/мл мах/на сут	Апоптоз (гибель), % /на сут
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

1-й тип Ph<sup>+</sup>клеток, P/D<sup>1</sup> ≥ 1. Эффективная пролиферация (скорость накопления незрелых Ph<sup>+</sup>клеток больше скорости созревания нейтрофилов). Концентрация [нз] > [з].

1	1.1 ПК	ХФ	b3a2 L115; 3 %;	12-4 4-1	14	0.14- 0.0 -0.27	0.17	0.53/ 7 -0.32 -0,65/ 14	(28/ 7 50/ 14)
2 3	1.2 КМ ПК	ХФ, ГОМ*	b3a2 L 72 бласты 3 %	1.2-1.6 2.4-1	8 8	0.41 0.5	0.2 0.2 / 3	0.67 0.58 / 3	33 / 4 (30/ 9)
4 5	1.3 КМ ПК	ФА ПХТ**	b2a2 бласты 17 %	3-9 1-13	> 8	0.1-0.54 0.1-0.31	0.13 / 8	0.17/ 0-4	(14/ 8)
6	1.4 ПК	БК лимфоидного типа, ПХТ**	b2a2 бласты 30 %	> 20- 2	> 6	0.0	0/ 0-6	0.4 / 6	(47/ 6)
7	1.5 ПК	ХФ, ГОМ*	b3a2 L 175 Бласты 5 %	1.2-2.5	< 8	0.14-0.53	0.08 / 4	0.32-0.2 / 4, 8	(21 / 7)

2-й тип Ph<sup>+</sup>клеток, P/D<sup>2</sup> ≤ 1. Эффективное созревание (скорость накопления нейтрофилов (зрелых) больше скорости накопления незрелых Ph<sup>+</sup>клеток. Концентрация [з] > [нз].

1	2.1 ПК	ХФ→ БК ГОМ*	b3a2, L 188-145, 2 %	0.3-0.8	> 6	1.0-1.62 -0.4	0.47/ 2	1.2/ 2	40/1 4/ 3 55/6
2	2.2 КМ	ХФ ГОМ* 4сут	b3a2	0.8-1.5	> 5	0.8-0.4-1.0	0.5 / 2	0.7/1 0.6/5	(4/1 11/ 5)
3	2.3 ПК	ХФ	b3a2	0.4-1.0	~ 6	0.4-0.8	0.25/3	0.7/3	(2/3 19/7)
4	2.4 ПК	ХФ, 2-я группа риска, ***	b3a2, L 165, бласты 2 %	0.3-1.2	~ 7	0.73/4 2.4/ 8	0.86/8	2.4/4 1.3/8	(2/4 33/11)
5	2.5 ПК	ХФ	b2a2	0.1-1.1- 1.6	~ 7	1.4/5	0.7/5	1.13/5	(3/2 2/5 17/7)
6 7	2.6 ПК КМ	ХФ	b3a2	0.2-1.0 0.3-1.0	> 9	8/6 24/11	0.41/6	0.7/6 0.1/11	(2/6 24/11)
8 9	2.7 КМ ПК	ХФ	b2a2	1.5 1.5	~ 4-6	- -	- -	1.1/3 1.3/7	(15/1 2/2-7 2/ 3 12/8)

Лечение до отбора пробы: \*гидроксимочевина; \*\*полихимиотерапия; \*\*\* реаферон.

ПК, КМ – периферическая кровь, костный мозг – источник мононуклеаров. ХФ, ФА и БК – хроническая фаза, фаза акселерации и бластный криз – фазы развития ХМЛ.

### ТИПЫ Ph<sup>+</sup> КЛЕТОК ОТ БОЛЬНЫХ ХМЛ

При миелопоэзе (ПД миелоидного отдела кроветворения) вначале пролиферируют с одновременной дифференцировкой гемопоэтические клетки-предшественники и их незрелые потомки. Затем по мере ПД без деления созревают нейтрофилы [3, 40, 41]. В данной работе получены и исследованы кинетические кривые ПД *ex vivo* 34 образца Ph<sup>+</sup>клеток из костного мозга (КМ) и периферической крови (ПК) 23 больных ХМЛ. Кривые демонстрируют заметные различия в ПД Ph<sup>+</sup>клеток от индивидуальных больных ХМЛ.

Кинетические кривые отражают скорость двух ключевых процессов, составляющих ПД: пролиферацию с одновременной дифференцировкой и дифференцировку без деления клеток (созревание нейтрофилов). При этом соотношение скоростей пролиферации (накопления клеток P) и созревания (клеток D) отражает эффективность пролиферации Ph<sup>+</sup>клеток относительно созревания нейтрофилов и выражается индексом P/D, который является мерой эффективности ПД. Как видно, скорость пролиферации может быть выше или ниже скорости созревания, и, следовательно, ПД протекает с преимуществом пролиферации

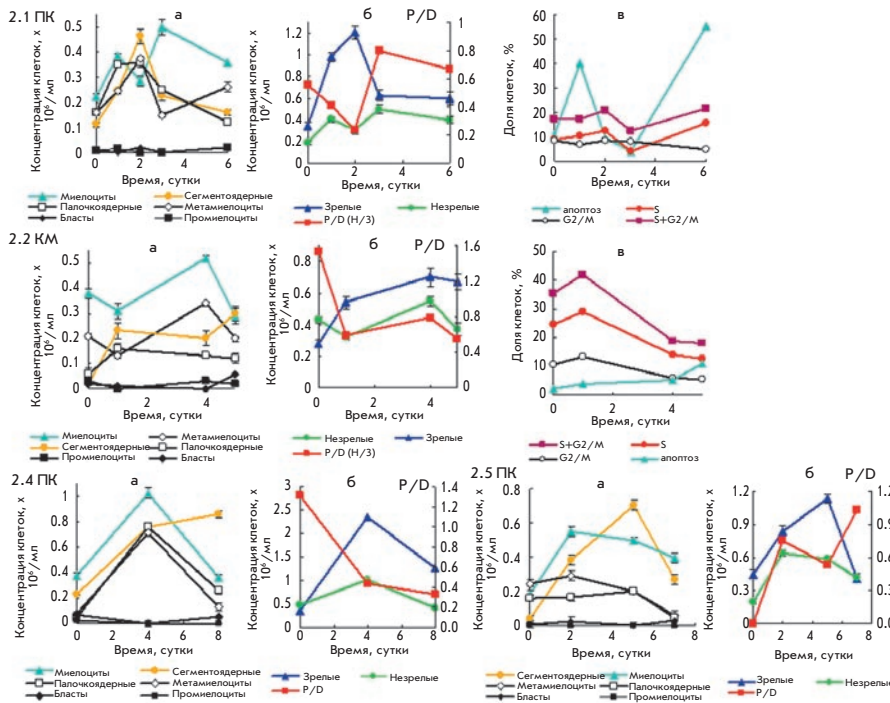


Рис. 2. Кинетические кривые образования и превращения субпопуляций Rh<sup>+</sup> клеток 2-го типа в составе мононуклеаров, выделенных из клеток КМ и/или ПК больных ХМЛ, в суспензионной культуре. Обозначения **2.1 ПК, 2.2 КМ, 2.4 ПК и 2.5 ПК** – образцы Rh<sup>+</sup> клеток от ХФ ХМЛ № 2.1, 2.2, 2.4 и 2.5 соответственно. При длительном наблюдении больных прогрессии ХМЛ не отмечено. Характеристика образцов и показатели пролиферации и дифференцировки Rh<sup>+</sup> клеток 2-го типа приведены в табл. 1

(эффективная пролиферация) или с преимуществом созревания (эффективное созревание). Индексы эффективности в первом случае  $P/D^1 \geq 1$ , во втором случае индексы эффективности  $P/D^2 \leq 1$  (рис. 1–4, табл. 1–3).

У ~ 20 % больных ХМЛ при ПД длительно протекает исключительно эффективная пролиферация. Это Rh<sup>+</sup> клетки 1-го типа, их  $P/D^1 = 1-20$  (рис. 1, б, табл. 1). При ПД Rh<sup>+</sup> клеток от других больных протекает только эффективное созревание с  $P/D^2 \leq 1$ . Это Rh<sup>+</sup> клетки 2-го типа, их обнаружено ~ 30 % (рис. 2, б, табл. 1). По ходу ПД индексы P/D этих клеток изменяются в границах своих P/D. На рис. 1, 2 и табл. 1 видно, что по продолжительности ПД Rh<sup>+</sup> клеток 1-го и 2-го типа (7–14 сут) сопоставима с 1–2 циклами дифференцировки клона гемопоэтических клеток [3, 40, 41].

Однако ПД Rh<sup>+</sup> клеток от большинства больных протекает с неоднократным чередованием эффективной пролиферации и эффективного созревания. Другими словами, чередование этапов либо с преимуществом скорости пролиферации и повышенным индексом  $P/D$   $P/D^1 \geq 1-4$ , либо с преимуществом созревания и с низким индексом  $P/D \leq 1$  (рис. 3, б, 4, б и табл. 2 и 3). Эти Rh<sup>+</sup> клетки составляют 3-й тип. Чередования эффективной пролиферации (1-й этап) и эффективного созревания нейтрофилов (2-й этап) видны по пересечениям кинетических кривых накопления пролиферирующих клеток (незрелых) и созревающих нейтрофилов (зрелых) (рис. 3 и 4, б, табл. 3). При ПД Rh<sup>+</sup> клеток 3-го типа встречаются одно-, двух- и трехкратные чередования этапов, которые сменяют друг друга по схемам: 1/2–1/2/1 или 2/1–2/1/2/1 с частотой чередования от 0.2–6 сут (табл. 2 и 3). При чередовании этапов ПД по схеме 1/2–1/2/1 скорости и, следовательно, концентрации клеток изменяются в ряду [нз] > [з] → [з] > [нз] → [нз] > [з] (рис. 3: 3.1–3.4, б). При чередовании этапов по схеме 2/1–2/1/2

скорости и концентрации изменяются в ряду: [з] > [нз] → [нз] > [з] → [з] > [нз] (рис. 4: 3.10–3.12, б). ПД Rh<sup>+</sup> клеток 1-го и 2-го типов можно рассматривать как частные случаи пролонгированных этапов чередования пролиферации и созревания ПД Rh<sup>+</sup> клеток 3-го типа.

В момент пересечения кривых эффективной пролиферации и эффективного созревания происходит смена этапов чередования, скоростей накопления Rh<sup>+</sup> клеток и других показателей ПД. В точках пересечения скорости пролиферации и созревания одинаковы, как и их индексы эффективности. При этом  $P/D = 1.06 \pm 0.23$ , и это значение не зависит от схемы, времени и последовательности чередования, а также от концентрации клеток (табл. 2 и 3). Точки пересечения можно назвать равновесными или критическими. Другие характеристики этапов пересечения, которые можно ожидать совпадающими, такие как концентрации незрелых клеток, зрелых нейтрофилов ( $0.4-0.7 \cdot 10^6/\text{мл}$ ) и СЯ ( $0.1-0.4 \cdot 10^6/\text{мл}$ ), также имеют близкие значения (табл. 3). Однако заметные колебания ( $1.53-0.1 \cdot 10^6/\text{мл}$  для КМ 3.5, ПК 3.10, 3.11 и КМ 3.12 в табл. 3) предполагают зависимость от концентрации.

В течение чередований характеристики этапов, напротив, постоянно меняются (табл. 2). Показатели увеличиваются или понижаются, проходят минимумы и максимумы. Эти события на этапах, как правило, происходят асинхронно друг другу (рис. 1–4 и табл. 2). Характер изменения индексов P/D зависит от этапа чередования. Они растут или уменьшаются в своих пределах:  $P/D^1 = 1-4$ ,  $P/D^2 \leq 1$ . Исключение составили клетки из КМ № 3.3, P/D<sup>1</sup> которых уменьшается от 11 до 1, что занимает 3 сут до момента равновесия и перехода к этапу созревания. На этапе созревания P/D<sup>2</sup> колеблется от 0.1–1 до нового этапа пролиферации, где индексы P/D<sup>1</sup> > 1. Это означает, что соотно-

Таблица 2. Показатели чередования этапов эффективной пролиферации и эффективного созревания при пролиферации и дифференцировке Ph<sup>+</sup>клеток 3-го типа в культуре

№ п/п и № рис.	№ ХМЛ (*)	Показатели этапа пролиферации Мах или интервал (сут)				Показатели этапа созревания Min, мах или интервал (сут)				[СЯ]/ [миелоци- тов]	Апоптоз (гибель), %
		P/D <sup>1</sup>	10 <sup>6</sup> клеток/мл			P/D <sup>2</sup> Min	Мах, 10 <sup>6</sup> клеток/мл				
			[нз]	[з]	[СЯ]		[нз]	[з]	[СЯ]		

Чередование этапов по схемам 1/2 или 1/2/1 с изменением скоростей накопления и концентраций [нз] > [з] → [з] > [нз] → [нз] > [з]

1, Рис. 3	3.1 КМ (1/2/1)	1.4-1.1 1,2-2,3	0.35-0.5 0.64- 0.5	0.29-0.5 0.63-0.2	0.1-0.25 0.3 -0.1	0.9 (на 3-е сут)	0,71 (на 3-е сут)	0.8 (на 3-е сут)	0.4 (на 3-е сут)	0.5-0.2	5-12
2, Рис. 3	3.2** ПК (1/2)	1.3-1.2	0.4	0.30	0.05	0.85	0.4-0.3	0.53	0.16	0.5 -0.25	< 5
3 4 Рис. 3	3.3 КМ ПК (1/2)	11- 2 1.32-1.5	0.6-0.46 0.5-0.8	0.02-0.5 0.4-0.5	0.01-0.4 0.14 -0.25	0.1 1.0-0.2	0.5-0.1 0.5- 0.1	0.6 (3 сут) 0.6 (7 сут)	0.4-0.2 0.3-0.2	0.1-2.5 0.1-1-2.5	(7 на 11-е сут)
5 Рис. 3	3.4 КМ (1/2/1)	1.2 1.53	0.4-0.8- 0.5-1.1	0.34	0.17	0.52-0.34	0.57-0.34	1.1	0.7	0.4-1.3-2	(18 на 5-е сут)
6	3.5 КМ (1/2)	3.43-1.0	1.95	1.65	0.03-0.37	1.0-0.3	1.53-0.4	1.53-1.21	0.37-0.5	0.19- 0.25-2.0	(30 на 11-е сут)
7	3.6 КМ (1/2)	1.61	0.61	0.52	0.24	0.28	0.13-0.56	0.52 -0.4-0.6	0.24	0.13 -0.5-1.0	(22 на 11-е сут)
8 9	3.7 КМ (1/2) ПК (1/2/1)	2.5-1.4 2.2-1.2 1.2-1.4	0.65-0.60 0.51-0.54 0.38-0.32	0.55 0.5 -0.54 0.4-0.2	0.3 0.05-0.19 0.15-0.07	0.7-0.4 0.78	0.55 0.57-0.38	0.83 0,73	0.53 0.27	0.1-0.5	(30 -35 на 10-11-е сут)
10	3.8 КМ (1/2)	3.9-1.5	0.53-0.35	0.14-0.35	0.02-0.22	1.5-0.5	0.35-0.23	0.35-0.44	0.2-0.4	0.04-0.3	(45 на 7-е сут)

Чередование этапов по схемам 2/1 или 2/1/2 с изменением скоростей накопления и концентраций [з] > [нз] → [нз] > [з] → [з] > [нз]

11, Рис. 4	3.10* ПК (2/1)↔	1.4 -3.1-2.0	0.3-0.6 -0.4	0.3-0.2	0.17-0.25	0.2-0.5	0.13-0.3	0.5-0.8-0.3	0.35-0.7	8.5-0.3	34-22 на 2-5-е сут
12, Рис. 4	3.11 ПК (2/1/2)↔	1.15-1.63	0.8-0.6	0.6-0.8-0.1	0.43-0.3	0.33-1.15 0.75-0.8	0.2-0.8, 0.6-0.8-0.1	0.5-1.3-0.8, 0.8-0.1	0.16-0.75-0.4, 0.39-0.06	1.2-0.2	35 на 1-е сут, 63 на 4-е сут
13, Рис. 4	3.12 КМ (2/1/2/1/2) ↔	1.0-1.32 1.0	0.7-0.78 0.24	0.6 0.24	0.14-0.35 0.12	0.5-0.7-1.0 1.0-0.8-1.0	0.6-0.7 0.6 0.2	0.4-0.95 0.6	0.14-0.5 0.34 0.1	0.9-0.2	7, 22 на 6, 11-е сут
14	3.13 ПК (2/1) ↔	1.7-2.5	0.39	0.4-0.2	0.2-0.1	0.45-1.7	0.42	0.9-0.4	0.3-0.2	0.9-1-9	(48 на 8-е сут)
15	3.14 КМ (2/1) ↔	1.0-1.34	0.6-0.5	0.4	0.4 - 0.2	1.1-0.7	0.4-1.0	0.4-1.37	0.12-0.92	0.3-1.0	(45 на 5-е сут)

Примечания: \*схема чередования; \*\*фаза акселерации; КМ – костный мозг, ПК – периферическая кровь; скобки [] обозначают концентрацию клеток; дефис – интервал значений на кинетической кривой. Стрелка ↔ указывает, что для чередования 2/1 и 2/1/2/1 данные приведены вначале для 1-го этапа и далее для этапа 2 в соответствии с подзаголовками таблицы.

шение скоростей пролиферации и созревания – их индексы эффективности P/D и концентрации пролиферирующих и созревающих клеток, особенно СЯ, являются весьма значимыми показателями ПД Ph<sup>+</sup>клеток.

Анализ кинетики образования субпопуляций гранулоцитов, кинетики апоптоза и распределения Ph<sup>+</sup>клеток в фазах клеточного цикла в сочетании с различиями в ин-

дексе эффективности P/D и в скоростях этапов ПД: пролиферации и созревания Ph<sup>+</sup>клеток приводит к следующим результатам.

ПД Ph<sup>+</sup>клеток 1-го типа протекает в условиях длительной эффективной пролиферации с индексами P/D > 1-2 – 20 и долей Ph<sup>+</sup>клеток в S+G2/M фазах клеточного цикла ≥ 20-45 % со скоростью пролиферации большей, чем

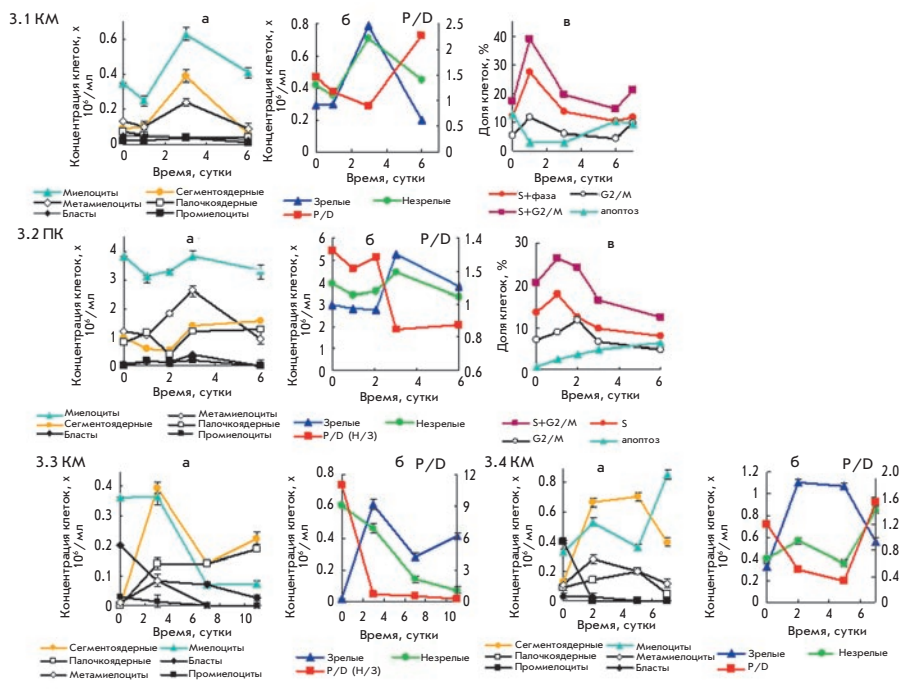


Рис. 3. Кинетические кривые дифференцировки в культуре Ph<sup>+</sup>клеток 3-го типа в составе мононуклеаров с чередованием эффективной пролиферации и эффективного созревания по схеме 1/2 и 1/2/1. Обозначения **3.1 КМ**, **3.2 ПК**, **3.3 КМ**, **3.4 КМ** соответствуют номерам образцов Ph<sup>+</sup>клеток от больных в ХФ ХМЛ. Характеристика образцов и показатели пролиферации и дифференцировки Ph<sup>+</sup>клеток 3-го типа приведены в табл. 2 и 3

скорость созревания (рис. 1.2, 1.3 а, б, в). ПД ведет к повышенному накоплению миелоцитов, промиелоцитов и/или бластов и низкому накоплению нейтрофилов (рис. 1, а, б: 1.1-1.3 и № 1.4 в табл. 1) при активном апоптозе (рис. 1, в). Чем ниже содержание нейтрофилов, созревающих без деления, тем выше индекс P/D (рис. 1: 1.1-1.3, б) и тем серьезнее прогрессия ХМЛ (табл. 1). Эти Ph<sup>+</sup>клетки выделены из КМ или ПК от больных ХМЛ в фазах ФА, БК и ХФ с активной прогрессией ХМЛ и составляют пятую часть исследованных проб Ph<sup>+</sup>клеток.

ПД Ph<sup>+</sup>клеток 2-го типа длительно протекает при эффективном созревании с низкой эффективностью P/D ≤ 1 при скорости созревания нейтрофилов выше скорости пролиферации в условиях блокирования апоптоза (рис. 2, табл. 1). ПД Ph<sup>+</sup>клеток 2-го типа ведет к значительному накоплению нейтрофилов, которые ингибируют пролиферацию Ph<sup>+</sup>клеток и миелоцитов. Блокирование апоптоза при созревании нейтрофилов происходит асинхронно накоплению миелоцитов и индукции апоптоза. Падение индекса P/D сопровождается накоплением СЯ, а рост P/D – расходом СЯ (рис. 2, а, б, в, и № 2.1 – 2.7 в табл. 1). Видно, что концентрация нейтрофилов существенно выше, чем пролиферирующих Ph<sup>+</sup>клеток.

Важная характеристика пролиферации – распределение клеток по фазам клеточного цикла. Кинетические кривые распределения Ph<sup>+</sup>гранулоцитов 2-го типа в фазах S и G2/M показывают, что их изменения по ходу ПД зависят от источника Ph<sup>+</sup>клеток – больного ХМЛ. На рис. 2.1, 2.2, в видно, что доля пролиферирующих Ph<sup>+</sup>клеток в фазах S+G2/M ≤ 20–40 %, а в G2/M фазах ~ 15 %. Другой показатель пролиферации – отношение S/(G2+M) равно 1.2. Максимальная доля клеток в S+G2/M фазе на 1 сут составляет 43 %, а в S фазе ~ 30 % и затем быстро понижается до 12 %. Индекс P/D при этом 0.6–0.8 (рис. 2.2, б). Доля про-

лиферирующих клеток 2-го типа (рис. 2.2, в) близка доле Ph<sup>+</sup>клеток 1-го типа (рис. 1.2, в). Однако продолжительность существования повышенной доли клеток в фазах S+G2/M у Ph<sup>+</sup>клеток 2-го типа короче, чем при пролиферации Ph<sup>+</sup>клеток 1-го типа, где доля пролиферирующих клеток ≥ 43 % поддерживается почти 6 сут с отношением S/(G2+M) ~ 2.4–2.7 и эффективностью P/D 1.2–1.6. Для ПД Ph<sup>+</sup>клеток 2-го типа это означает преимущество скорости созревания над пролиферацией. При культивировании доля пролиферирующих злокачественных клеток линии K562 (производной от бластного криза ХМЛ), в фазах S+G2/M достигает 44 ± 3 % и мало изменяется в течение 7 сут. Отношение S/(G2+M) при этом достигает 4.4. По сравнению с этими величинами ПД Ph<sup>+</sup>клеток 2-го типа характеризуется пониженной долей клеток в фазах клеточного цикла S+ G2/M (< 20 – 40 %) при укороченной продолжительности пролиферации (< 3 сут) и низким индексом эффективности P/D ≤ 1 (рис. 2.1 и 2.2, б, в).

Кинетические кривые дифференцировки Ph<sup>+</sup>лейкоцитов 2-го типа показывают до 80 % содержания гранулоцитов, а миелоциты в субпопуляциях Ph<sup>+</sup>лейкоцитов составляют не более 25 %. Содержание зрелых нейтрофилов, особенно СЯ, при этом достигает ~ 40 % (рис. 2.1-2.5, б и № 2.1-2.6 в табл. 1). В процессе ПД СЯ и все нейтрофилы активно накапливаются и мало расходуются. Максимальная концентрация СЯ временами в 2 раза больше, чем миелоцитов (рис. 2.1–2.5, а, б, в и табл. 1), что указывает на роль зрелых клеток, особенно СЯ, в регуляции ПД Ph<sup>+</sup>клеток 2-го типа.

В совокупности обнаруживается, что популяция Ph<sup>+</sup>лейкоцитов этого типа увеличивается в 2–4 раза при низких индексах эффективности P/D и скорости пролиферации ниже скорости созревания. При этом накапливаются нейтрофилы, особенно СЯ, падает содержание миелоцитов при пониженном апоптозе. В совокупности

Таблица 3. Характеристика пересечений при чередовании этапов пролиферации и созревания Ph<sup>+</sup>клеток 3-го типа в культуре

№ п/п (№ Рис.)	№ больного ХМЛ	Схема чередования этапов	Точки пересечения кривых скоростей накопления пролиферирующих [незрелых] (1-й этап) и созревающих клеток [зрелых] (2-й этап)			Концентрация клеток в точках пересечения, 10 <sup>6</sup> клеток /мл на этапах		
			Время пересечения, сут	Продолжительность (сут) этапов 1 2	Индексы P/D в точках пересечения № 1 2 3	Незрелых и зрелых 1 2	Сегментоядерных (СЯ) 1 2	
1 (3)	3.1 КМ	1/2/1	2; 3.5	2 1.5; 2.5	1.1; 1.2; -	0.5; 0.65	0.24; 0.34	
2 (3)	3.2 ПК	1/2	2.5; -	2.5 > 4.5	1.06; - -	0.4; -	0.1; -	
3 (3) 4	3.3 КМ	1/2	2.5; -	2.5; 8.5	~ 2; - -	0.49; -	0.26; -	
	ПК	1/2	5.5; -	5.5; 5.5	1.0; - -	0.53; -	0.38; -	
5 (3)	3.4 КМ	1/2/1	0.2; 6	~ 0.2; 5.8	1.15; 12; -	0.37; 0.8	0.17; 0.58	
6	3.5 КМ	1/2	5; -	5; 3	1.0; - -	1.53; -	0.37; -	
7	3.6 КМ	1/2	4.5; -	4.5; 3.5	1.06; - -	0.53; -	0.24; -	
8 9	3.7 КМ	1/2	2.5; -	2.5; 8.5	1.5; - -	0.53; -	0.4; -	
	ПК	1/2/1	2.5; 8.5	2.5; 8.5	1.2; 1.25 -	0.54; 0.4	0.17; 0.15	
10	3.8 КМ	1/2	5; -	5; > 2	1.5; - -	0.35; -	0.15; -	
11	3.10 ПК ↔	2/1	3; -	4 3	1.4; - -	0.33; -	0.3; -	
12 Рис. 7	3.11 ПК ↔	2/1/2/1	5.5; 7.5; 11	2; 5.5 0; 3.5	1.15 1.15 0.80	0.75; 0.6 0.1	0.43; 0.3 0.06	
	3.12 КМ ↔	2/1/2/1/2	4.5; 6; 0; 8	1.5; 4.5; 0; 2.5 1	1.05; 1.0; 1.0 1.0	0.62; 0.72 0.24; 0.24	0.13; 0.35 0.11; 0.34	
14	3.13 ПК ↔	2/1	4.0; - -	1; 4	1.7; - -	0.4	0.2	
15	3.14 КМ ↔	2/1	4.0; - -	1; 4	1.0; - -	0.6	0.4	

Примечания: КМ – костный мозг, ПК – периферическая кровь; Стрелка ↔ указывает, что для чередования 2/1 и 2/1/2/1 данные приведены вначале для 1-го этапа и далее для этапа 2 в соответствии с подзаголовками таблицы. Среднее значение индекса эффективности P/D при пересечении кривых скоростей этапов пролиферации и созревания на 1-м и 2-м этапах чередования 1.06 ± 0.23 (21.7 %).

это означает, что нейтрофилы, накапливаясь в избытке при блокировании апоптоза, ингибируют пролиферацию клеток, из которых сами образуются, а также тормозят дифференцировку самих нейтрофилов в ряду СЯ, ПЯ и ММ, вероятно, по механизму обратной связи.

Соотношение [СЯ]/[М] (обычно малая величина) при ПД клеток 2-го типа увеличивается, становится более единицы и демонстрирует накопление СЯ нейтрофилов, синхронное уменьшению накопления миелоцитов. Обращает внимание максимальное накопление нейтрофилов на 2-е или 4-е сут (рис. 2.2.1 и 2.4, а, б), которое соответствует минимальному накоплению миелоцитов и низкому индексу P/D. На рис. 2.1–2.5, а, б, виден рост индекса P/D при уменьшении концентрации созревающих без деления нейтрофилов на четыре сутки ПД.

Количество Ph<sup>+</sup>клеток 2-го типа составляет треть исследованных образцов, все они выделены от больных ХМЛ в хронической фазе (ХФ). Клиническое наблюдение за больными ХМЛ с 2-м типом ПД показывает повышенную продолжительность их жизни при успешной терапии.

ПД Ph<sup>+</sup>клеток 3-го типа происходит при неоднократном чередовании эффективной пролиферации (1-й этап) с эффективным созреванием (2-й этап) и изменениями индексов эффективности P/D<sup>1</sup> > 1 на P/D<sup>2</sup> ≤ 1 (табл. 2 и 3). На 1-х этапах чередования накопление миелоцитов в условиях индукции апоптоза больше накопления созревающих нейтрофилов. На 2-х этапах чередования апоптоз блокируется, нейтрофилы накапливаются в повышенной концен-

трации и ингибируют пролиферацию Ph<sup>+</sup> клеток (рис. 3, 4, табл. 2 и 3). При этом, кроме того, наблюдается инверсия порядка накопления нейтрофилов, как и при ПД Ph<sup>+</sup> клеток 2-го типа (рис. 2–4, а, б, в), что рассматривается ниже.

Переход к следующему этапу чередования 1 по схемам 1/2/1 и 2/1/2 сопровождается индукцией апоптоза, истощением СЯ и накоплением пролиферации незрелых Ph<sup>+</sup>клеток. Таким образом, при прохождении контрольного пересечения кривых скоростей пролиферации и созревания происходит смена этапов чередования и изменение эффективной пролиферации на эффективное созревание, или наоборот, характеристики и показатели ранее пройденного такого же этапа чередования восстанавливаются.

Индексы эффективности P/D зависят от этапа чередования (ПД), что обсуждалось выше (табл. 2 и 3).

Первый этап чередования ведет к росту индекса эффективности P/D<sup>1</sup> > 1, следующее чередование – к низкому индексу P/D<sup>2</sup> < 1. В итоге попеременное чередование высокоэффективной пролиферации Ph<sup>+</sup>клеток с низкоэффективным созреванием нейтрофилов приводит к умеренному росту и падению эффективности ПД Ph<sup>+</sup>клеток (табл. 3 и рис. 3 и 4). Таким путем поддерживается умеренная эффективность ПД в целом. Этому механизму чередования соответствуют попеременное изменение параметров ПД Ph<sup>+</sup>клеток 3-го типа (табл. 2 и 3). Совокупность этих результатов означает участие СЯ и других созревающих нейтрофилов в регуляции ПД Ph<sup>+</sup>клеток 3-го типа с ингибированием пролиферации Ph<sup>+</sup>клеток на этапе эффектив-



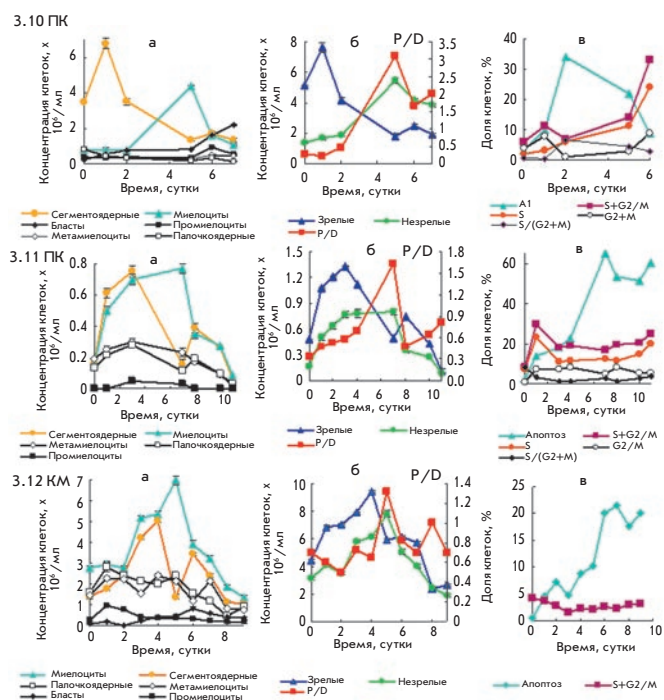


Рис. 4. Кинетические кривые образования и превращения субпопуляций Rh<sup>+</sup>клеток 3-го типа с чередованием эффективной пролиферации и эффективного созревания дифференцировки по схеме 2/1 и 2/1/2 в составе моноуклеаров, выделенных из клеток КМ и/или ПК больных ХФ ХМЛ. Обозначения а, б и в даны на рис. 1. Rh<sup>+</sup>клетки 3.10 ПК, 3.11 ПК и 3.12 КМ – от больных в ХФ ХМЛ № 3.10, 3.11 и 3.12

ного созревания. При ПД Rh<sup>+</sup>клеток 2-го типа наблюдается такая же регуляция, как на этапе эффективного созревания Rh<sup>+</sup>клеток 3-го типа.

Чередование этапов эффективных пролиферации и созревания по схеме 1/2, начинаясь с 1-го этапа (рис. 3.6, табл. 2), по характеристикам согласуется с 1-м типом ПД Rh<sup>+</sup>клеток. Содержание миелоцитов и пролиферирующих клеток в фазах клеточного цикла S+G2/M > 30–45 % на 1-2-е сут (рис. 3) повышается, а содержание нейтрофилов СЯ падает. На 2-м этапе чередования концентрация нейтрофилов СЯ повышается, индекс P/D<sup>2</sup> падает ≤ 1, содержание миелоцитов уменьшается. Доля Rh<sup>+</sup>клеток в фазах клеточного цикла S+G2/M оказывается ≤ 25 %. К моменту становления следующего 1-го этапа – этапа пролиферации к 7-м сут доля клеток в S+G2/M фазах снова растет (рис. 3, в) и остальные показатели 1-го этапа восстанавливаются. По показателям чередование 1-го и 2-го этапов аналогичны ПД Rh<sup>+</sup>клеток 1-го и 2-го типов соответственно, но ограничены меньшей продолжительностью. В сумме клетки на 1-м этапе пребывают в течение 4–5 сут - в 3 раза дольше, чем на 2-м этапе (табл. 3).

Второму этапу чередования ПД 3-го типа Rh<sup>+</sup>клеток – созреванию Rh<sup>+</sup>клеток соответствуют значения P/D<sup>2</sup> ≤ 1, высокая концентрация СЯ и минимальная концентрация миелоцитов (рис. 4, а, б, в, и № 3.10–3.14 в табл. 2). С индукцией апоптоза и уменьшением концентрации СЯ снова

начинается рост P/D<sup>1</sup> и накопление миелоцитов. Максимумы P/D<sup>1</sup> и накопления миелоцитов совпадают с минимумом концентрации СЯ на пятые сутки. Накопление зрелых нейтрофилов ведет к падению P/D<sup>1</sup> и уменьшению концентрации миелоцитов и становлению этапа эффективного созревания. Это согласуется с характеристикой ПД Rh<sup>+</sup>клеток 2-го типа и клеток других больных с 3-м типом дифференцировки по схеме 2/1/2 (рис. 4, а, б, в; данные других образцов Rh<sup>+</sup>клеток в табл. 2).

Ингибирование апоптоза и пролиферации миелоцитов клетками СЯ видно на рис. 3 и 4, а, б, в, и др. в табл. 2. При этом чем активнее пролиферация Rh<sup>+</sup>клеток и активнее апоптоз, тем выше индекс P/D<sup>1</sup> (например, рис. 3, а, б, в, и табл. 2).

Особенность ПД Rh<sup>+</sup>клеток по схеме 2/1/2, которая начинается с этапа 2, состоит в быстром и значительном накоплении СЯ в начале дифференцировки и значительном блокировании апоптоза, подавлении пролиферации Rh<sup>+</sup>клеток и торможении дифференцировки. Апоптоз и гибель клеток с максимумом на 2–5-е сут составляет ~ 35 % (рис. 4, а-в), что по времени соответствует расходованию и гибели СЯ. Вначале максимум роста клеток на этапе созревания связан с накоплением и расходованием СЯ; второй максимум пролиферации Rh<sup>+</sup>клеток наблюдается уже при переходе к пролиферации по мере гибели СЯ (рис. 4: 3.10, в).

Доля клеток в фазах клеточного цикла для чередования 2/1 и 2/1/2 также связана с накоплением СЯ, которое соответствует пониженной доле клеток в S+G2/M фазах. Так, на рис. 4, а-в видны максимумы на 1-е сут ~ 10 % (рис. 4: 3.10 КМ), ~ 25 % (3.11 ПК) и менее 5 % (3.12 КМ). На 2–10-е сут доля пула заметно уменьшается. При очередном непродолжительном этапе пролиферации на 10–11-е сут доля пула незначительно увеличивается одновременно с ростом индекса P/D<sup>1</sup>. Вместе с падением P/D<sup>2</sup> это означает ингибирование пролиферации Rh<sup>+</sup>клеток нейтрофилами, и тем большее, чем чаще наблюдается чередование этапов созревания с большей продолжительностью.

На рис. 4: 3.12, а-в, при чередовании 2/1/2/1 видно значительное ингибирование пролиферации с P/D<sup>2</sup> = 0.1–0.9. За 11 сут при чередованиях 2/1/2/1 доля клеток в фазах клеточного цикла S+G2/M оказывается ниже 5 %. При низкой пролиферации на этапе эффективного созревания апоптоз ниже 10 %; его доля на 6–11-е сут растет лишь до 20 %, и то при переходе к 1-му этапу. Суммарное пребывание Rh<sup>+</sup>клеток в условиях эффективного созревания клеток № 3.12 в три раза дольше, чем на 1-м этапе. Это приводит к самому значительному ингибированию пролиферации и апоптоза из исследованных Rh<sup>+</sup>клеток 3-го типа. На рис. 4: 3.11, а, б, в максимум апоптоза соответствует минимуму накопления СЯ, максимуму накопления миелоцитов и росту индекса P/D<sup>1</sup>.

Третий тип пролиферации и дифференцировки обнаружен у ~ 50 % исследованных Rh<sup>+</sup>клеток (все от больных в хронической фазе ХМЛ). Из них 2/3 составляют Rh<sup>+</sup>клетки с чередованием этапов 1/2 и 1/2/1.

Блокирование апоптоза, накопление сегментоядерных нейтрофилов (СЯ) и ингибирование пролиферации Rh<sup>+</sup>клеток 2-го и 3-го типа нейтрофилами на этапе эффективного созревания. Последовательность дифференцировки клеток, созревающих без деления, по определению

представлена превращениями в ряду  $M \rightarrow MM \rightarrow ПЯ \rightarrow СЯ$  с выходом СЯ в апоптоз. Накопление созревающих нейтрофилов падает в ряду  $СЯ > ПЯ > MM$  [3]. В культуре при отсутствии возможности транспорта СЯ в другие ткани СЯ должны погибнуть по механизму апоптоза, и значительное накопление СЯ означает блокирование апоптоза.

При созревании  $Ph^+$ клеток 2-го типа и на 2 этапах чередования ПД  $Ph^+$ клеток 3-го типа обнаруживаются подавление апоптоза, повышение концентрации созревающих нейтрофилов, ингибирование накопления миелоцитов и понижение доли пролиферирующих клеток в фазах  $S+G2/M$  клеточного цикла и/или уменьшение их пребывания в этих фазах. Эти события объясняют ингибирование пролиферации нейтрофилами на стадии созревания в условиях блокирования апоптоза. Отметим, что обычно индукция апоптоза наблюдается при истощении в среде цитокинов [16–18, 25, 26, 29, 43–45]. При ПД  $Ph^+$ клеток на этапах созревания апоптоз блокируется без введения цитокинов в среду.

При концентрации СЯ  $\sim 2 \cdot 3 \cdot 10^5$  клеток/мл и повышенном пуле клеток в  $S+G2/M$  фазах наблюдается весьма низкий апоптоз ( $< 5-10\%$ ); на 5-е сут он едва достигает  $10\%$  (рис. 2.2, а, в). Гибель клеток в других случаях, определяемая окрашиванием трипановым синим, также ингибирована. В случаях клеток 2.2–2.4 КМ и 2.6 ПК апоптоз не превышает  $10-20\%$  (табл. 1). В случае рис. 2.1, а, в, на 1-е сут пролиферации апоптоз достигает максимума в  $40\%$  и  $60\%$  на 6-е сут при синхронном увеличении накопления миелоцитов. Это означает, что ингибирование накопления миелоцитов зависит не прямо от блокирования апоптоза, а опосредовано нейтрофилами, накапливающимися вследствие ареста апоптоза.

При ПД 2-го типа  $Ph^+$ клеток СЯ нейтрофилы даже способны накапливаться отдельным пиком с максимумом на 2-6-е сут (при  $[СЯ] > 0.2-0.3 \cdot 10^6$ /мл), что видно на рис. 2.1, 2.5 и 2.4, а, б. Этому соответствует низкий апоптоз и минимум накопления миелоцитов (рис. 2.1, б, в). При этом кривая накопления миелоцитов прерывается на время значительного накопления СЯ (максимум на 2-е сут), а индекс  $P/D$ , как следствие, понижается. Пролiferация миелоцитов подавлена до тех пор, пока не снизится концентрация СЯ в результате апоптоза. После гибели значительной части СЯ закономерность накопления популяции миелоцитов восстанавливается, а индекс  $P/D$  увеличивается (рис. 2.1, б), но остается  $\leq 1$ . На рис. 2.1, а, б, в максимум накопления СЯ на 1-е и 5-е сут также соответствует минимуму накопления миелоцитов, уменьшению  $P/D$  и активации гибели клеток в этот период. Аналогичное накопление СЯ (на 2–5-е сут) подавляет накопление миелоцитов и понижает  $P/D$ , что видно на рис. 2.5, а, б. Гибель СЯ на 5-е сут восстанавливает рост концентрации миелоцитов и значение  $P/D$ . На рис. 2.2, а, б также видно, что максимум накопления СЯ соответствует минимуму накопления миелоцитов, т.е. максимальному ингибированию накопления миелоцитов. При этом максимумы накопления миелоцитов и активность апоптоза на рис. 2.1, а, б, в синхронны. При ПД  $Ph^+$ клеток 3-го типа на этапах эффективного созревания видны те же закономерности.

Итак, низкая эффективность ПД  $Ph^+$ клеток 2-го и 3-го типа на стадиях эффективного созревания в условиях блокирования апоптоза ведет к значительному накопле-

нию нейтрофилов, к уменьшению скорости пролиферации по сравнению со скоростью созревания и к ингибированию пролиферации  $Ph^+$ клеток. Ингибирование пролиферации  $Ph^+$ клеток нейтрофилами происходит при чередовании на всех этапах эффективного созревания и означает участие нейтрофилов в регуляции ПД  $Ph^+$ клеток.

В регуляции ПД  $Ph^+$ клеток 2-го и 3-го типа можно выделить ряд взаимозависимых процессов, синхронно и асинхронно протекающих. Так, ингибирование апоптоза с накоплением нейтрофилов, созревающих без деления, происходит асинхронно накоплению миелоцитов, индукции апоптоза и росту эффективности. Накопление миелоцитов синхронно индукции апоптоза, активации пролиферации и росту эффективности  $P/D$ .

*Инверсия порядка (последовательности) накопления созревающих нейтрофилов.* Нейтрофилы, созревающие без деления (клетки D), по определению дифференцируются в ряду:  $M \rightarrow MM \rightarrow ПЯ \rightarrow СЯ$  с выходом СЯ в апоптоз [3, 40, 41, 45]. При одинаковых скоростях их дифференцировки можно ожидать тот же порядок накопления этих субпопуляций. В отдельных случаях ПД – при ПД  $Ph^+$ клеток 1-го типа и на этапах эффективной пролиферации  $Ph^+$ клеток 3-го типа – такой порядок соблюдается.

При чередовании на этапах созревания  $Ph^+$ клеток 2-го и 3-го типов значения максимумов накопления нейтрофилов на кинетических кривых указывают на изменение порядка их накопления (рис. 2, 3 и 4, а 3.10–3.14; табл. 1–3). Это означает, что скорость накопления СЯ, ПЯ и ММ изменяется неравномерно и порядок их накопления при ПД инвертирует. Накопление миелоцитов в области пиков нейтрофилов при этом понижается. Более того, порядок накопления нейтрофилов из одних и тех же  $Ph^+$ клеток инвертирует в процессе их созревания, а при переходе к пролиферации восстанавливается.

На рис. 2, а видно, что изменения порядка с увеличением или уменьшением скоростей накопления нейтрофилов происходят часто. Это показывают пересечения кривых накопления отдельных нейтрофилов с изменением их направления. Так, ряд  $M > ПЯ > MM \sim СЯ$ , видимый на 1-е сут, последовательно инвертирует в  $СЯ > MM \sim ПЯ > M$  на 2-е сут, в  $M > ПЯ \sim СЯ > MM$  на 3-е сут и в ряд  $M > MM > СЯ > ПЯ$  на 6-е сут. На этом рисунке одинаковые скорости накопления нейтрофилов позже пересечения кривых на 4.5-е сут приводят почти к обычному порядку накопления нейтрофилов –  $M \gg MM > СЯ \geq ПЯ$ . На рис. 2:2.1, б видны: обычный порядок накопления –  $M > MM > ПЯ > СЯ$  в нулевой момент культивирования, но инверсия этого порядка приводит к  $M > СЯ > ПЯ \sim MM$  на 1-е сут, затем к  $M \gg MM > СЯ > ПЯ$  на 4-е сут и позже к накоплению СЯ при убыли М, ММ и ПЯ. На рис. 2:2.4, а почти равные скорости накопления 3-х нейтрофилов на 4-е сут ( $M > ПЯ \sim СЯ \sim MM$ ), на 8-е сут приводят к  $СЯ \gg M > ПЯ > MM$ . На рис. 2:2.5, а порядок накопления  $M > СЯ > MM > ПЯ$  на 2-е сут переходит в  $СЯ > M \gg MM \sim ПЯ$  на 5-е сут.

Совокупность этих результатов означает, что изменения порядка накопления, т.е. скоростей накопления нейтрофилов в сумме и относительно друг друга (или относительно миелоцитов), происходят достаточно часто по ходу кинетических кривых накопления нейтрофилов. Восстановление обычного порядка накопления нейтрофилов соответствует

повышению содержания миелоцитов и индекса эффективности P/D и тем способствует переходу к эффективной пролиферации. Изменение скорости и инверсия порядка накопления нейтрофилов, будучи синхронными уменьшению индексов эффективности P/D (рис. 1 и 4, г; 2, 3 и 4, б), указывают на непосредственное участие нейтрофилов в регуляции ПД Ph<sup>+</sup>клеток 2-го типа с ингибированием их пролиферации.

На этапе созревания Ph<sup>+</sup> клеток 3-го типа при чередовании по схемам 1/2, 1/2/1 на рис. 3, а инверсия последовательностей накопления видна при изменении рядов М > ММ > СЯ > ПЯ в М > СЯ > ММ > ПЯ и затем снова в М > ММ > СЯ ~ ПЯ. При чередованиях по схеме 2/1 и 2/1/2 инверсия порядка накопления нейтрофилов заметна на рис. 4, а. При этом концентрации нейтрофилов уменьшаются в ряду [СЯ] >> [М] > [ПЯ] > [ММ], как и индекс P/D (рис. 4, б).

Итак, при созревании в максимуме накопления нейтрофилов наблюдается инверсия порядка накопления нейтрофилов, которая способна восстанавливать исходный порядок их накопления при переходе к этапу эффективной пролиферации. Степень инверсии и восстановления порядка накопления нейтрофилов зависит от продолжительности этапов созревания и пролиферации. Инверсия порядка накопления М, ММ, ПЯ и СЯ оказывается еще одним интересным свойством ПД Ph<sup>+</sup>клеток 2-го и 3-го типов в культуре. Первыми изменяют скорость и степень накопления СЯ нейтрофилы, затем следуют ПЯ и ММ нейтрофилы.

Нейтрофилы при эффективном созревании накапливаются в значительных концентрациях в результате блокирования апоптоза (рис. 2) и участвуют в регулировании ПД Ph<sup>+</sup>клеток 2-го и 3-го типов не только ингибированием пролиферации Ph<sup>+</sup>клеток, но и торможением дифференцировки самих нейтрофилов. Торможение дифференцировки нейтрофилов Ph<sup>+</sup>клеток 2-го и 3-го типов выявляется при инверсии первоначального порядка накопления нейтрофилов с повышением их концентрации (рис. 2, 3 и 4, а также в табл. 1–3). Инверсия первоначального порядка накопления нейтрофилов ведет к постепенному изменению последовательности накопления нейтрофилов М > ММ > ПЯ > СЯ в последовательность СЯ > ПЯ > ММ > М и к росту их концентрации в том же порядке, вероятно, по механизму обратной связи. Наблюдаемая инверсия порядка накопления и рост концентрации нейтрофилов являются, очевидно, следствием поэтапного торможения дифференцировки последовательно каждого нейтрофила по цепочке обратной связи и ведут последовательно к их накоплению по ходу дифференцировки ПЯ и ММ и, тем самым, к торможению (нарушению регуляции) созревания самих нейтрофилов. Иными словами, накопление СЯ ингибирует созревание ПЯ, а ПЯ в свою очередь угнетает созревание ММ. В конце концов, тормозится вся цепь созревания нейтрофилов, что повышает их концентрацию. При этом нейтрофилы угнетают пролиферацию Ph<sup>+</sup> клеток и подавляют эффективность ПД. В следующий период по достижении «критической» концентрации нейтрофилов индуцируется апоптоз. Это освобождает нейтрофилы от прессы обратной связи, восстанавливает первоначальный порядок накопления нейтрофилов, их концентрация уменьшается и регуляция созревания нейтрофилов восстанавливается,

что сопровождается ростом индекса эффективности P/D и переходом к эффективной пролиферации Ph<sup>+</sup>клеток.

*Роль чередования пролиферации и созревания.* Чередование активной пролиферации и созревания с ингибированием пролиферации, происходящих с разной эффективностью и с преимуществом скорости то пролиферации, то созревания нейтрофилов, имеет периодичный или волновой характер. Их параметры проходят через максимумы и минимумы синхронных и асинхронных процессов. Активация пролиферации и накопление миелоцитов синхронны индукции апоптоза, росту эффективности P/D<sup>1</sup> > 1, но асинхронны накоплению нейтрофилов, ингибированию ими пролиферации, инверсии порядка созревания нейтрофилов и изменению индекса эффективности P/D<sup>2</sup> в пределах ≤ 1 (рис. 2–4, табл. 1–3).

Отметим, что в регуляции ПД Ph<sup>+</sup>клеток можно выделить ряд взаимозависимых процессов, синхронно и асинхронно протекающих. Так, ингибирование апоптоза с накоплением нейтрофилов, созревающих без деления, происходит асинхронно накоплению миелоцитов и индукции апоптоза. Накопление миелоцитов синхронно индукции апоптоза, активации пролиферации с ростом индекса P/D и восстановлению регуляции созревания и пролиферации.

В точках пересечения чередований параметры ПД выравниваются. При ПД Ph<sup>+</sup>клеток 1-го и 2-го типов наблюдается «необратимая» регуляция ПД данного цикла дифференцировки. Изменения свойств Ph<sup>+</sup>клеток 3-го типа обратимы: при чередовании этапов ПД свойства, ингибируемые на предыдущем этапе чередования, способны восстановиться. Возможно, Ph<sup>+</sup>клетки 3-го типа по регуляции ПД ближе к норме, чем Ph<sup>+</sup>клетки 1-го и 2-го типов. Все три типа Ph<sup>+</sup>клеток, очевидно, зависят от наследуемых особенностей гена *bcr/abl* у разных больных ХМЛ. Отметим, что регуляция ПД Ph<sup>+</sup>клеток внутри трех обнаруженных типов Ph<sup>+</sup>клеток от разных больных ХМЛ различается по количественным характеристикам эффективности P/D, ингибирования апоптоза, накопления СЯ и степени ингибирования пролиферации Ph<sup>+</sup>клеток. При ПД Ph<sup>+</sup> клеток 1-го и 2-го типов индексы эффективности P/D изменяются в своих границах: P/D<sup>1</sup> > 1 или P/D<sup>2</sup> ≤ 1 соответственно (рис. 1 и 2, табл. 1). Это указывает на некоторую степень регуляции ПД Ph<sup>+</sup>клеток в пределах P/D<sup>1</sup> > 1 или P/D<sup>2</sup> без изменения исходного преимущества скорости либо пролиферации, либо созревания.

Различия в регуляции ПД связаны со свойствами Ph<sup>+</sup>клеток от разных больных ХМЛ в разных фазах ХМЛ. Очевидно, что эффективность ПД определяют предшественники миелоидных клеток, содержащиеся в Ph<sup>+</sup>моноклеарах и наследующие мутации в гене *bcr/abl* и тирозинкиназе p210 от разных больных ХМЛ. Мутации, которые способны в линиях Ph<sup>+</sup>клеток определять туморогенность, жизнеспособность клеток, активность пролиферации и блокирование апоптоза, исследованы в работах [7, 17, 18, 25, 27, 29, 30].

Чередование пролиферации и созревания Ph<sup>+</sup>клеток *ex vivo* с повышением и понижением эффективности ПД участвует в регуляции и поддержании оптимального режима ПД Ph<sup>+</sup>клеток. Чередование попеременно включает при блокировании апоптоза ингибирование пролиферации созревающими нейтрофилами, особенно СЯ, являющимися

потомками тех же пролиферирующих Ph<sup>+</sup>клеток. Клеточная регуляция СЯ нейтрофилами, очевидно, опосредует генную регуляцию с участием гена *bcr/abl*. Эти результаты хорошо согласуются с данными о раздельной трансформирующей и антиапоптотической активности различных мутантов тирозинкиназы p210<sup>*bcr/abl*</sup> в клеточных линиях, происходящих благодаря изменению путей сигнальной трансдукции с участием тирозинкиназы p210 [8, 9, 15, 17, 18, 20, 27, 30, 31].

В итоге попеременное чередование эффективной пролиферации и эффективного созревания со сменой повышенных индексов эффективности на весьма низкие приводит к уменьшению общей эффективности ПД Ph<sup>+</sup>клеток 2-го и 3-го типов и таким путем поддерживает умеренный, возможно оптимальный, режим ПД. На этапах созревания регуляция ПД опосредуется ростом содержания нейтрофилов, особенно СЯ, ингибированием пролиферации с уменьшением индексов эффективности и нарушением порядка созревания нейтрофилов Ph<sup>+</sup>клеток 2-го и 3-го типов.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Обнаруженная регуляция ПД Ph<sup>+</sup>клеток *ex vivo* выявляет клеточные аспекты генной регуляции ПД. Клеточная регуляция, как следует из данной работы, опосредуется чередованием пролиферации Ph<sup>+</sup>клеток с их созреванием и осуществляется ингибированием пролиферации созревающими без деления нейтрофилами – потомками тех же пролиферирующих Ph<sup>+</sup>клеток-предшественников в условиях блокирования апоптоза.

Ранее в литературе клеточная регуляция ПД гемопоэтических клеток и такой ее механизм не рассматривались [4–7, 9–12, 15, 16, 21–23, 27, 30]. Сведения о клеточной регуляции ПД Ph<sup>+</sup>клеток нейтрофилами, созревающими без деления, и о регуляции чередованием этапов с высокой и низкой эффективностью ПД до наших исследований отсутствовали. Нет также данных об относительных скоростях пролиферации и созревания, эффективности этих этапов ПД и ее количественном выражении в виде индекса P/D. Соотношение содержания пролиферирующих гемопоэтических клеток и созревающих нейтрофилов в отдельных пробах ПК ранее обозначалось индексом созревания [2].

Пролиферации миелоидных клеток-предшественников, начального звена регуляции ПД Ph<sup>+</sup>клеток, изучались многими исследователями [4, 5, 7, 8, 10–12, 15, 16, 20, 23–25, 26]. Она определяется пролиферативным потенциалом и концентрацией CD34 миелоидных клеток-предшественников. Активация пролиферации Ph<sup>+</sup>клеток зависит от экспрессии онкогена *bcr/abl*, его мутаций и большей скорости выхода полипотентных стволовых Ph<sup>+</sup>клеток из G<sub>0</sub> в G<sub>1</sub> фазу клеточного цикла по сравнению с клетками без Ph хромосомы [20, 23, 24]. Регуляция пролиферации – первого звена механизма ПД Ph<sup>+</sup>клеток охарактеризована в некоторой степени и в настоящей работе с помощью кинетического подхода к исследованию ПД. Это видно из параметров ПД Ph<sup>+</sup>клеток 1-го типа и чередований с эффективной пролиферацией ПД Ph<sup>+</sup>клеток 3-го типа. В работах [33, 39] показано участие CD34<sup>+</sup>миелоидных клеток-предшественников и экспрессии онкогена *bcr/abl* Ph<sup>+</sup>клеток из ПК ХМЛ № 1.1, исследованного здесь в регуляции ПД Ph<sup>+</sup>клеток

1-го типа. При этом максимально высокие уровни экспрессии антигена CD34 и экспрессии онкогена *bcr/abl* совпадают с высокой эффективностью в начале ПД Ph<sup>+</sup>клеток.

В работе [28] при исследовании субпопуляций Ph<sup>+</sup>клеток от больных в ХФ ХМЛ, выделенных цитофлуориметрически на сортере, показана прямая зависимость пролиферации миелоидных Ph<sup>+</sup>клеток-предшественников в ХФ ХМЛ от экспрессии *bcr/abl* онкогена. Авторы установили уменьшение пролиферирующей доли Ph<sup>+</sup>клеток в фазах S+G2/M клеточного цикла для субпопуляций Ph<sup>+</sup>клеток в 4 раза для миелоцитов и в 7 раз для ПЯ + СЯ нейтрофилов по сравнению с CD34<sup>+</sup>клетками. Прямая линейная корреляция доли Ph<sup>+</sup>клеток в фазах S+G2/M клеточного цикла и экспрессии *bcr/abl* наблюдалась для CD34 клеток, миелобластов и промиелоцитов. Но далее по ходу дифференцировки корреляция инвертировалась. Это означало, что активное накопление пула пролиферирующих Ph<sup>+</sup>клеток в S+G2/M фазах в начале пролиферации прямо пропорционально увеличению экспрессии *bcr/abl* гена, а при ПД от миелоцитов к ПЯ и СЯ и приобретает обратно пропорциональную зависимость. Кинетика в этой работе не изучалась. Использовались данные для каждого из 9 больных в ХФ ХМЛ. Наши результаты хорошо объясняют инверсию этой корреляции в работе [28] изменением механизма пролиферации Ph<sup>+</sup>клеток из-за ингибирования пролиферации Ph<sup>+</sup>клеток нейтрофилами, в избытке накапливающимися из-за блокирования апоптоза.

Совокупность данных работы Primo et al. [28] и результатов настоящей работы свидетельствует о парадоксальном механизме действия *bcr/abl* на Ph<sup>+</sup>клетки. Экспрессия онкогена *bcr/abl* в пролиферирующих миелоидных Ph<sup>+</sup>клетках-предшественниках активирует пролиферацию, но позже созревающие Ph<sup>+</sup>нейтрофилы, наследующие тот же онкоген *bcr/abl*, ингибируют пролиферацию. Иными словами, активирующий пролиферацию эффект экспрессии онкогена *bcr/abl* в Ph<sup>+</sup>клетках ранней дифференцировки подавляется экспрессией того же онкогена в потомках тех же Ph<sup>+</sup>клеток более позднего созревания. Это можно объяснить, например, изменением путей сигнальной трансдукции с участием тирозинкиназы p210 и изменением спектра СТАТ белков, продуцируемых в нейтрофилах и по силе эффекта зависящих от концентрации одного из нейтрофилов.

В ряде работ высказана альтернативная гипотеза возникновения и прогрессии ХМЛ, которая в качестве причины ХМЛ рассматривала не активацию пролиферации Ph<sup>+</sup>клеток из-за неуправляемой экспрессии p210<sup>*bcr/abl*</sup>, а дисбаланс самоподдержания стволовых клеток и более поздней дифференцировки клеток [20–24, 13–14, 26]. Клеток-предшественников при этом образуется меньше, чем в норме (или не больше), а их потомков оказывается в норме меньше, чем при ХМЛ. Нарушение регуляции созревания Ph<sup>+</sup>клеток в качестве первичного биологического дефекта при ХМЛ рассматривали давно [13, 14, 21, 22, 42]. На примере ПД Ph<sup>+</sup>клеток 2-го и 3-го типов в нашей работе видно, что такой «дисбаланс» осуществляется нейтрофилами, ингибирующими пролиферацию Ph<sup>+</sup>клеток на стадии созревания в условиях блокирования апоптоза. Обнаруженные здесь различия в регуляции ПД с ингибированием пролиферации нейтрофилами в условиях

блокирования апоптоза и чередования пролиферации с созреванием Ph<sup>+</sup>клеток от разных больных ХМЛ, наследующих различные мутации в гене *bcr/abl*, вполне объясняют противоречия, касающиеся «дисбаланса самоподдержания и созревания» Ph<sup>+</sup>клеток.

Возможно, что ингибирование пролиферации нейтрофилами в процессе чередования пролиферации и созревания при блокировании апоптоза также регулирует ПД гемопоэтических клеток в норме. При ХМЛ этот механизм, вероятно, является попыткой Ph<sup>+</sup>клеток защититься от активации пролиферации при экспрессии гена *bcr/abl*, ведущей к прогрессии ХМЛ. Угроза прогрессии ХМЛ видна на примере ПД Ph<sup>+</sup>клеток 1-го типа при индукции апоптоза и отсутствии избытка нейтрофилов.

## ВЫВОДЫ

1. Регуляция пролиферации и дифференцировки *ex vivo* Ph<sup>+</sup>клеток от разных больных ХМЛ осуществляется при чередовании эффективной пролиферации с эффективным созреванием. На этапе созревания протекает ингибирование пролиферации Ph<sup>+</sup>клеток накапливающимися нейтрофилами при блокировании апоптоза, что прерывает пролиферацию и поддерживает ПД в оптимальном режиме.

2. Чередование этапов состоит в переключении этапа 1 – этапа эффективной пролиферации, протекающего с большей скоростью пролиферации Ph<sup>+</sup>клеток, чем скорость созревания нейтрофилов, на этап 2 – этап эффективного созревания, при котором блокируется апоптоз и скорость созревания нейтрофилов больше скорости пролиферации Ph<sup>+</sup>клеток. Чередование протекает по схемам: 1/2 – 1/2/1

или 2/1–2/1/2. Этапы чередований проходят контрольные точки пересечения, в которых показатели этапов пролиферации и созревания одинаковы. Индексы эффективности P/D в контрольных точках пересечения равны  $1.06 \pm 0.23$  и не зависят от времени и порядка чередования, а также от источника Ph<sup>+</sup>клеток – больных ХМЛ. На этапах чередования эти показатели постоянно изменяются.

3. На этапах пролиферации повышено содержание пролиферирующих клеток, понижено содержание нейтрофилов, особенно СЯ, и индуцирован апоптоз. На этапах созревания, напротив, апоптоз блокирован, повышено содержание нейтрофилов, особенно СЯ, и понижено содержание незрелых. На этапе эффективного созревания нейтрофилы, накапливаясь в повышенной концентрации, ингибируют пролиферацию незрелых Ph<sup>+</sup>клеток, претерпевают инверсию порядка созревания нейтрофилов и торможение своего созревания, вероятно, по механизму обратной связи.

4. По различиям в регуляции ПД идентифицированы три типа Ph<sup>+</sup>клеток у больных ХМЛ, которые отличаются числом и продолжительностью этапов чередования. Это Ph<sup>+</sup>клетки, ПД которых протекает либо с одним длительным этапом эффективной пролиферации, либо с одним длительным эффективным созреванием, либо с неоднократным чередованием эффективных этапов пролиферации и созревания. Первые соответствуют прогрессирующим фазам ХМЛ, вторые и третьи относятся к хронической фазе ХМЛ с положительной реакцией на химиотерапию ХМЛ. ●

Работа поддержана РФФИ,  
(грант 06-04-08372-офи).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Абдулкадыров К.М., Бесемельцев С.С., Рукавицын О.А. Хронический миелолейкоз: СПб.: Специальная литература, 1998. 463 с.
- Руководство по гематологии. / Ред. А.И. Воробьев. Т. 1. М.: Ньюдиамед, 2002. 280 с.
- Патофизиология крови. / Ред. Ф.Д. Шифман. BINOM Publishers. 2000. 446 с.
- Deininger M.W.N., Goldman J.M., Melo J.V. // *Blood*. 2000. V. 96. P. 3343–3356.
- Deininger M.W.N., Vieira S., Mendiola R., et al. // *Cancer research*. 2000. V. 60. P. 2049–2055.
- Медведева Н.В. Хронический миелолейкоз в 50-м ежегодном конгрессе американского гематологического общества. // *Клиническая онкогематология*. 2009. Т. 2. № 1. С. 85–88.
- Melo J.V. // *Blood*. 1996. V. 88. P. 2375–2384.
- Holyoake T.L., Jiang X., Eaves A.C., Eaves C.J. // *Leukemia*. 2002. V. 16. P. 549–558.
- Holyoake T.L., Jiang X., Jorgensen H.G. et al. // *Blood*. 2001. V. 97. P. 720–728.
- Jamieson C.H.M., Ailles L.E., Dylla S.J. et al. // *New England J Medicine*. 2004. V. 351. P. 657–667.
- Jaiswal S., Traver D., Miyamoto T. et al. // *Proc.Nat.Acad.* 2003. *Sci. USA*. V. 100. P. 10002–10007.
- Passagué E., Jamieson C.H.M., Ailles L.E., Weissman I.L. // *Proc.Nat.Acad. Sci.* 2003. *USA*. V. 100. P. 11842–11849.
- Strife A., Lambek C., Wisniewski D. et al. // *Blood*. 1983. V. 62. P. 389–397.
- Strife A., Lambek C., Wisniewski, et al. // *Cancer Res*. 1988. V. 48. P. 1035–1041.
- Era T., Witte O.N. // *Proc. Nat. Acad.* 2000. *Sci. USA*. V. 97. P. 1737–1742.
- Guzman M.L., Jordan C.T. // *Cancer Control*. 2004. V. 11, № 2. P. 97–104.
- Bedi A., Zehnbauber B.A., Barber J. et al. // *Blood*. 1994. V. 83. P. 2038–2044.
- Bedi A., Barber J.P., Bedi G.C. et al. // *Blood*. 1995. V. 86. P. 1148–1158.
- Brandford S., Rudzki Z., Walsh S. et al. // *Blood*. 2002. V. 99. P. 3472–3475.
- Buckle A.M., Mottram R., Pierce A. et al. // *Mol. Med*. 2000. V. 6. P. 892–902.
- Clarkson B., Strife A., Perez A. et al. // *Leukemia & Lymphoma*. 1993. V. 11. P. 81–100.
- Clarkson B., Strife A. // *Leukemia*. 1993. V. 7. P. 1683–1721.
- Coppo P., Bonnet M.L., Dusanter-Fourt I. et al. // *Oncogene*. 2003. V. 22(26). P. 4102–4110.
- Traycoff C.V., Haistead B., Rice S. et al. // *Brit. J. Haematology*. 1998. V. 102. P. 759–767.
- Lotem J., Sachs L. // *Leukemia*. 1996. V. 10. P. 925–9313.
- Lugo T.G., Pendergast A.M., Muller A.J., Witte O.N. // *Science*. 1990. V. 247. P. 1079–1082.
- Cortez D., Kadlec L., Pendergast A.M. // *Mol.cell. biology*. 1995. № 10. P. 5531–5541.
- Primo D., Flores J., Quijano S. et al. // *Brit.J. Haematology*. 2006. V. 135. P. 43–51.
- Amarante-Mendes G.P., Naekyung Kim C., Liu L. et al. // *Blood*. 1998. V. 91. P. 1700–1705.
- Selleri C., Maciejewski J.P., Pane F., et al. // *Blood*. 1998. V. 92. P. 981–989.
- Sherbenou D.W., Hantschel O., Turaga L. et al. // *Leukemia*. 2008. V. 22. P. 1184–1190.
- Stoklosa T., Poplawski T., Koptyra M., et al. // *Cancer Res*. 2008. V. 68. P. 2576–2580.
- Ахлынина Т.В., Герасимова Л.П., Саркисян Г.П. и др. // *Цитология*. 2007. Т. 49. С. 889–900.
- Абрамов М.Г. Гематологический атлас. М.: Медицина, 1985. 344 с.
- Герасимова Л.П., Манакова Т.Е., Ахлынина Т.В. и др. // *Росс. Биотерапевт. журнал*. 2002. Т. 1. № 4. С. 29–38.
- Пинегин Б.В., Ярилин А.А., Симонова А.В. и др. Цитофлуориметрический метод оценки апоптоза активированных лимфоцитов периферической крови человека с помощью пропидиума иодида. // В кн.: *Применение проточной цитофлуориметрии для оценки функциональной активности иммунной системы человека*. М., МЗ РФ, 2001. С. 48–53.
- Шмаров Д.А., Козинец Г.И. Способы анализа клеточного цикла при помощи проточной цитофлуориметрии. // В кн.: *Лабораторно-клиническое значение проточного цитометрического анализа крови*. М.: Медицинское информационное агентство, 2004. С. 49–65.
- Dean P.N. // *Cell Tissue Kinet.* 1980. V. 13. P. 299–302.
- Гринева Н.И., Барышников А.Ю., Герасимова Л.П. и др. // *Росс. биотерапевт. журнал*. 2007. Т. 6. № 2. С. 21–32.
- Козинец Г.И., Котельников В.М. // *Советская медицина*. 1983. № 4. С. 3–77.
- Котельников В.М., Козинец Г.И., Касаткина В.В., Ковалевская Н.П. Кинетика гранулоцитопоза. // В кн.: *Кинетические аспекты гемопоэза*. Изд-во Томского гос. ун-та, 1982. С. 149–211.
- Golde D.W., Cline M.J. // *New Engl. J. Med*. 1973. V. 288. P. 1083–1086.
- Владимирская Е.Б. Механизмы апоптоза клеток крови. // *Лабораторная медицина*. 2001. № 4. С. 47–54.
- Владимирская Е.Б. Апоптоз и его роль в развитии опухолевого роста. // В кн.: *Биологические основы противоопухолевой терапии*. М.: Агат-Мед, 2001. С. 5–32.
- Dublez L., Eymun B., Sordet O. et al. // *Blood*. 1998. V. 91. P. 2415–2422.
- Goldman J.M., Th'ng K.G., Catovsky D., Galton D.A.D. // *Blood*. 1976. V. 47. P. 381–388.

УДК 577.29

# Дезаминирование остатков 5-метилцитозина в клетках млекопитающих

Е.В. Громенко<sup>1</sup>, П.В. Спирин<sup>2</sup>, Е.А. Кубарева<sup>3</sup>, Е.А. Романова<sup>3</sup>, В.С. Прасолов<sup>2</sup>,  
О.В. Шпанченко<sup>1,3</sup>, О.А. Донцова<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Химический факультет МГУ, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3, ГСП-1, МГУ

<sup>2</sup> Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

<sup>3</sup> Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, 119991, Москва, Ленинские горы, МГУ, НИИФХБ

\*E-mail: olgash@genebee.msu.ru

**РЕФЕРАТ** Деметилирование ДНК в клетках млекопитающих происходит после оплодотворения и во время эмбриогенеза, сопутствует клеточному старению и раковой трансформации. С помощью реакции удлинения праймера, MALDI MS и расщепления ДНК тимин-ДНК-гликозилазой показано, что обработка модельных метилированных ДНК-дуплексов ядерными экстрактами клеток линий CHO, HeLa и Skov3 приводит к дезаминированию остатков 5-метилцитозина. Высказано предположение о том, что дезаминирование 5-метилцитозина является первой стадией процесса деметилирования у млекопитающих.

**Ключевые слова:** дезаминирование 5-метилцитозина, деметилирование 5-метилцитозина, реакция удлинения праймера, MALDI MS, тимин-ДНК-гликозилаза.

**Список сокращений:** mC – 5-метил-2'-дезоксцитидин, ПЦР – полимеразная цепная реакция, ПААГ – полиакриламидный гель, TDG – тимин-ДНК-гликозилаза, MALDI MS – масс-спектрометрия с ионизацией методом лазерной матричной десорбции.

## ВВЕДЕНИЕ

Активное деметилирование ДНК у млекопитающих необходимо для правильного развития организма, формирования иммунного ответа и памяти. Деметилирование ДНК сопровождается возникновением различных болезней и старением организмов.

Глобальное деметилирование наблюдается в отцовском пронуклеусе в эмбрионах мышей [1], крыс, свиней, коров и человека [2], а также в их гоноцитах. Оно обеспечивает эпигенетическое репрограммирование и специфическую экспрессию генов.

Метилирование и деметилирование ДНК в клетках нервной системы влияют на синаптическую пластичность и формирование памяти. Метилирование ДНК необходимо для инактивации гена *pp1*, подавляющего процессы памяти, в то время как активное деметилирование ДНК связано с активацией гена *рилина*, способствующего формированию памяти у крыс [3]. Также активное деметилирование ДНК необходимо для нормального нейрогенеза в эмбрионах рыб вида *Danio rerio*. Подавление экспрессии Gadd45a (Growth arrest and DNA-damage-inducible protein 45 alpha) или других белков, участвующих в процессе деметилирования, приводит к гибели нейронов в результате гиперметилирования и подавления экспрессии генов, обеспечивающих нейрогенез [4].

Метилирование и деметилирование ДНК является важной частью эпигенетического контроля при иммунном ответе [5]. Деметилирование промоторных участков генов цитокинов *il-2* и *ifn-γ* при контакте CD8 Т клеток с антигенами приводит к быстрой экспрессии цитокинов [6–8].

Деметилирование ДНК сопутствует клеточному старению [9]. При этом для крыс показана разница в степени деметилирования в различных тканях – в ткани мозга она выше, чем в ткани печени. Также было обнаружено возрастное снижение содержания 5-метилцитозина в ДНК для клеток легких и фибробластов кожи, причем для последних показана связь деметилирования со снижением возможности роста в культуре [10].

Глобальное деметилирование генома наблюдается во всех изученных раковых клетках [11–13]. При этом гипометилированными участками оказываются многочисленные повторы, импринтированные гены, тканеспецифические гены, онкогены и гены, связанные с процессами инвазии и метастазирования опухолей [14, 13]. В то же время некоторые локусы, включая многие гены опухолевых супрессоров, гиперметилированы, что приводит к подавлению их экспрессии [12, 15, 16].

Очевидно, что деметилирование ДНК играет огромную роль в жизнедеятельности клетки, при этом механизм деметилирования ДНК и участники этого процесса у млекопитающих до сих пор не установлены. Целью настоящей работы являлось изучение механизма деметилирования ДНК в клетках млекопитающих.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Синтез олигодезоксирибонуклеотидов.** Олигонуклеотиды I–III синтезированы амидофосфитным методом в автоматическом режиме на синтезаторе фирмы Applied Biosystems с использованием коммерческих реагентов и раство-

рителей по стандартному регламенту:

5'-CATGTCTAACmCGmCGmCGAGAAATGGTAATG  
TATGGAGT\* (I)

5'-CATACATTACCATTCTmCGmCGmCGGTTAGACAT  
GGC\* (II)

5'-CATACATTACCATTTC (III), где \* – аминогруппа, соединенная с 3'-концом олигодезоксирибонуклеотидов линкером.

Олигонуклеотиды

5'-TT(Biotin-T)TTTTTTTGTCTACGATCGAACmCG  
mCGmCGAGAAGCTTGTAT\* (IV), 5'-ATACAAGCTTCTm  
CGmCGmCGGTTTCGATCGTAGACAAAAA\* (V) –  
коммерческие препараты («Синтол»).

**Культивирование клеточных линий и приготовление ядерных экстрактов.** Перевиваемые клетки яичников китайского хомячка линии CHO, карциномы шейки матки человека линии HeLa и аденокарциномы яичников человека линии Skov3 выращивали на стандартной среде DMEM, содержащей 10 % эмбриональной сыворотки (FCS), 4 mM L-глутамина, 1 mM пирувата натрия, стрептомицин/пенициллин в концентрации 100 мкг/мл и 100 ед./мл, соответственно, при температуре 37 °C в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>. Для пересева клеток клеточный монослой промывали буфером PBS (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4), добавляли стандартный раствор трипсин-ЭДТА (Sigma) и помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор на 3–5 мин, добавляли среду с FCS и суспендировали пипетированием, клетки рассевали в необходимое количество культуральных флаконов. Клетки, выросшие до монослоя, собирали центрифугированием при 2300 об/мин в течение 10 мин при 4 °C. Затем клетки промывали несколько раз буфером PBS и лизировали в буфере L (20 mM Hepes (pH 7.6), 10 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 % глицерин, 0.1 % Triton X100, 1 mM DTT, коктейль ингибиторов протеиназ). Через 2 мин лизат суспендировали и центрифугировали 20–30 с при 10000 об/мин. К осадку добавляли равный объем буфера NE (20 mM Hepes (pH 7.6), 500 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 % глицерин, 0.1 % Triton X100, 1 mM DTT, коктейль ингибиторов протеиназ), тщательно суспендировали и помещали на качалку на 30–60 мин. Затем лизат центрифугировали 10 мин при 10 000 об/мин.

**Формирование ДНК-дуплекса и обработка ядерным экстрактом клеток.** Формирование ДНК-дуплекса I/II проводили на приборе для ПЦР, выдерживая 20 мкл реакционной смеси, содержащей 500 пмоль олигонуклеотида I и 550 пмоль олигонуклеотида II, при 95 °C 3 мин и далее охлаждая термостат с 95 до 35 °C со скоростью 0.5 °/мин и с 35 до 20 °C со скоростью 0.25 °/мин.

Далее 50 мкл реакционной смеси, содержащей буфер NE, 10 мкМ ДНК-дуплекса I/II и ядерный экстракт, соответствующий ~ 50 000 клеток, инкубировали при 37 °C в течение 1 ч. После трехкратной фенольной депротеинизации ДНК-дуплекс осаждали 2.5 объемами этанола с добавлением 1/10 объема 3 M NaOAc (pH 5.5) в течение 2 ч при –20 °C. Осадок отделяли центрифугированием при 14 000 об/мин в течение 10 мин, промывали 70 %-ным этанолом, высушивали в вакууме, растворяли в 20 мкл воды.

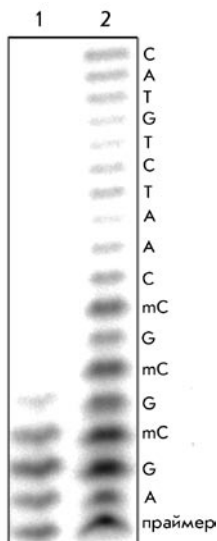
**Реакция удлинения праймера.** Предварительно вводили радиоактивную метку на 5'-конец праймера III. Для этого 20 мкл реакционной смеси, содержащей буферный

раствор для T4 полинуклеотидкиназы (500 mM Tris-HCl (pH 7.6), 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT, 1 mM спермидин, 1 mM ЭДТА, 1 mM ADP), 10 мкМ праймера III, 5 единиц T4-полинуклеотидкиназы (MBI Fermentas, 10 ед./мкл) и 10 мкМ [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]АТР (GE Healthcare, удельная активность 220 ТБк/ммоль или 6000 Ки/ммоль), инкубировали при 37 °C в течение 1 ч. Фермент инактивировали нагреванием в течение 15 мин при 75 °C. <sup>32</sup>P-меченный праймер III очищали электрофорезом в денатурирующем 12 %-ном ПААГ. Зону с праймером III, содержащим радиоактивную метку, визуализовали с помощью радиоавтографии и вырезали. Праймер III элюировали из геля 400 мкл буфера GES (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 % SDS, 0.5 % Triton X100, 50 mM ЭДТА) с добавлением 400 мкл фенола при интенсивном перемешивании в течение ночи. Водную фазу отделяли центрифугированием при 14 000 об/мин в течение 5 мин, праймер III осаждали, как описано выше, и растворяли в 20 мкл воды. Количество праймера III оценивали либо по радиоактивности, либо спектрофотометрически по поглощению раствора при длине волны 260 нм. Далее к 3 мкл <sup>32</sup>P-меченного очищенного праймера III (3.3 мкМ) добавляли 4 мкл раствора ДНК-дуплекса I/II (2.5 мкМ) и 1 мкл 10x реакционного буфера (500 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT), гибридизацию проводили на приборе для ПЦР при охлаждении термостата с 70 до 42 °C со скоростью 0.4 °/мин с выдерживанием температуры 21 с и увеличением каждого следующего времени цикла на 1 с. Затем к реакционной смеси добавляли 5 единиц фрагмента Кленова, лишённого экзонуклеазной активности (MBI Fermentas, 10 ед./мкл), и 1 мкл смеси dATP, dCTP, dTTP (1 mM каждого), ddNTP (0.01 mM). Реакционную смесь инкубировали при 37 °C в течение 10 мин. Реакцию останавливали нагреванием до 75 °C в течение 10 мин. Анализ продуктов реакции удлинения праймера проводили электрофорезом в денатурирующем 10 %-ном ПААГ. Гель высушивали под вакуумом, экспонировали на экран BAS CASSETTE 2340, информацию с экрана считывали на приборе FUJIFILM FLA 3000 с помощью программы BASReader 3.14.

**Обработка ДНК-дуплексов тимин-ДНК-гликозилазой (TDG).** 20 мкл реакционной смеси, содержащей 0.5 мкМ ДНК-дуплекса I/II, <sup>32</sup>P-меченного по одной из цепей, 10 единиц TDG (R&D Systems, 5 ед./мкл) и буфер (10 mM Hepes (pH 7.4), 100 mM KCl, 10 mM ЭДТА), инкубировали при 65 °C в течение 1 ч. Далее добавляли 10 мкл 3-кратного щелочного буфера (300 mM NaOH, 97 % формамид, 0.2 % бромфеноловый синий), инкубировали при 95 °C в течение 10 мин и быстро охлаждали до 2–8 °C. Продукты реакции анализировали электрофорезом в 20 %-ном ПААГ. Гель высушивали с помощью вакуумной сушилки, экспонировали на экран BAS CASSETTE 2340, информацию с экрана считывали на приборе FUJIFILM FLA 3000 с помощью программы BASReader 3.14.

**Анализ фрагментов ДНК с помощью масс-спектрометрии.** Биотинилированный ДНК-дуплекс IV/V формировали, как описано выше, для дуплекса I/II, обрабатывали ядерным экстрактом клеток и проводили очистку на стрептавидин-сефарозе. Стрептавидин-сефарозу предварительно уравновешивали в буфере R (100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, 0.1 мг/мл БСА). Для этого смешивали 100 мкл 50 %-ной суспензии стрептавидин-сефарозы

**Рис. 1.** Реакция удлинения праймера без dGTP для метилированного олигодезоксирибонуклеотидного дуплекса, обработанного буфером для экстрактов (контроль) (1), ядерным экстрактом клеток линии CHO (2). Справа приведен фрагмент последовательности модельного олигодезоксирибонуклеотида I



и 200 мкл буфера R, инкубировали при слабом перемешивании в течение 10–15 мин. Стрептавидин-сефарозу осаждали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 3–4 мин, заменяли буфер и ресуспендировали. Вышеописанную процедуру повторяли 5 раз. К уравновешенной сефарозе добавляли 500 пмоль биотинилированного ДНК-дуплекса IV/V. Связывание дуплекса с сефарозой проводили при мягком перемешивании при 4 °С в течение 2–12 ч. После этого смолу промывали 6 раз 1 мл буфером R, как описано выше. Далее к реакционной смеси добавляли по 30 единиц эндонуклеаз рестрикции HindIII (MBI Fermentas, 10 ед./мкл) и PvuI (MBI Fermentas, 10 ед./мкл) и выдерживали при слабом перемешивании при 37 °С в течение 16 ч. Стрептавидин-сефарозу осаждали центрифугированием при 5000 об/мин в течение 5 мин. Полученные фрагменты разделяли электрофорезом в денатурирующем 20 %-ном ПААГ. Гель окрашивали SYBR Green в буферном растворе TBE (100 мМ Tris-HCl, 100 мМ H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 2 мМ ЭДТА). Анализируемый фрагмент элюировали из геля согласно методике, описанной для праймера. Далее образцы концентрировали и обессоливали на ZipTip C18 (Millipore). Промывку сорбента проводили 50 мМ водным раствором цитрата аммония, олигонуклеотид элюировали 25 мМ раствором цитрата аммония в 50 %-ном ацетонитриле. На матрице для MALDI MS смешивали по 1 мкл образца, 0,5 мкл 50 мМ раствора цитрата аммония и 0,5 мкл раствора 3-гидроксипиколиновой кислоты (Fluka, 20 мг/мл в ацетонитриле), полученную смесь высушивали на воздухе. Масс-спектры были получены на тандемном MALDI-времяпролетно-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex II BRUKER (Германия), оснащенном УФ-лазером (Nd). Масс-спектры получены в режиме положительных ионов в линейной моде.

**ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ВЫВОДЫ**

Для изучения процесса деметилирования ДНК были сконструированы и синтезированы комплементарные олигодезоксирибонуклеотиды I и II, которые содержали по 3 остатка 5-метилцитозина в составе динуклеотидов 5'-mCpG, что

характерно для генома млекопитающих. Для защиты от нуклеаз, содержащихся в лизатах клеток, на выступающих 3'-концах образующийся ДНК-дуплекс I/II имел защитные группы.

Для наблюдения за изменениями в последовательности нуклеотидов использовали реакцию удлинения праймера III, комплементарного 3'-концевой области олигонуклеотида I. При проведении реакции в отсутствие в среде dGTP и в присутствии ddNTP удлинение праймера должно проходить до первого остатка 5-метилцитозина (дорожка 1, рис. 1). Обработка ДНК-дуплекса I/II ядерным экстрактом клеток линии CHO приводит к появлению более длинных продуктов удлинения праймера (дорожка 2, рис. 1). Это явление можно объяснить превращением 5-метилцитозина в тимин, т.е. протеканием процесса дезаминирования при обработке ДНК-дуплекса I/II экстрактом клеток CHO.

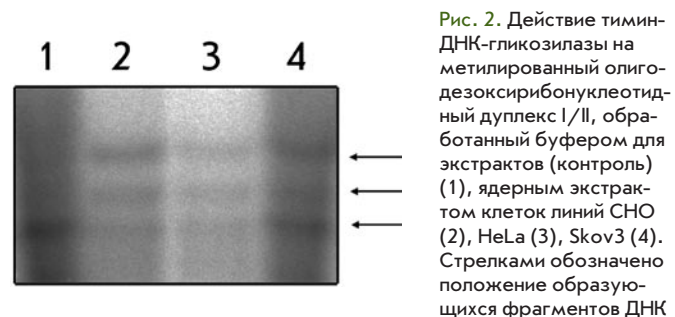
Для проверки этого предположения ДНК-дуплекс I/II с тремя участками 5'-mCpG последовательно обрабатывали ядерным экстрактом клеток линий (CHO, HeLa или Skov3) и тимин-ДНК-гликозилазой, которая узнает T/G-мисматчи и разрезает цепь ДНК, содержащую T (рис. 2, дорожки 2, 3, 4, соответственно). После разделения продуктов реакции на радиоавтографе геля наблюдается появление полос, соответствующих положению остатков 5-метилцитозина, что свидетельствует об их дезаминировании.

Дезаминирование ДНК-дуплексов при обработке ядерными экстрактами клеток было показано методом MALDI MS. Для этого был использован олигодезоксирибонуклеотидный дуплекс IV/V, содержащий динуклеотиды 5'-mCpG, участки узнавания эндонуклеаз рестрикции HindIII и PvuI, фланкирующие анализируемый фрагмент (подчеркнут), а также остаток биотина на 5'-конце для возможности очистки ДНК-дуплекса на стрептавидин-сефарозе.

Размер анализируемого участка, содержащего три сайта 5'-mCpG, составляет 14 нуклеотидов, расчетная молекулярная масса – 4404,8 Да (рис. 3, а).

Спектры анализируемого фрагмента, полученного из ДНК-дуплекса после обработки ядерным экстрактом клеток линий (CHO, HeLa или Skov3), содержат сигнал 4408 Да (рис. 3, б-г), соответствующий дезаминированию трех остатков 5-метилцитозина.

Клеточные линии CHO, HeLa и Skov3 являются производными раковых клеток, в которых, как известно, наблюдается глобальное деметилирование всего генома. Возможно, наблюдаемое в результате обработки ядерными экстрактами клеток этих линий дезаминирование 5-метилцитозина



**Рис. 2.** Действие тимин-ДНК-гликозилазы на метилированный олигодезоксирибонуклеотидный дуплекс I/II, обработанный буфером для экстрактов (контроль) (1), ядерным экстрактом клеток линий CHO (2), HeLa (3), Skov3 (4). Стрелками обозначено положение образующихся фрагментов ДНК



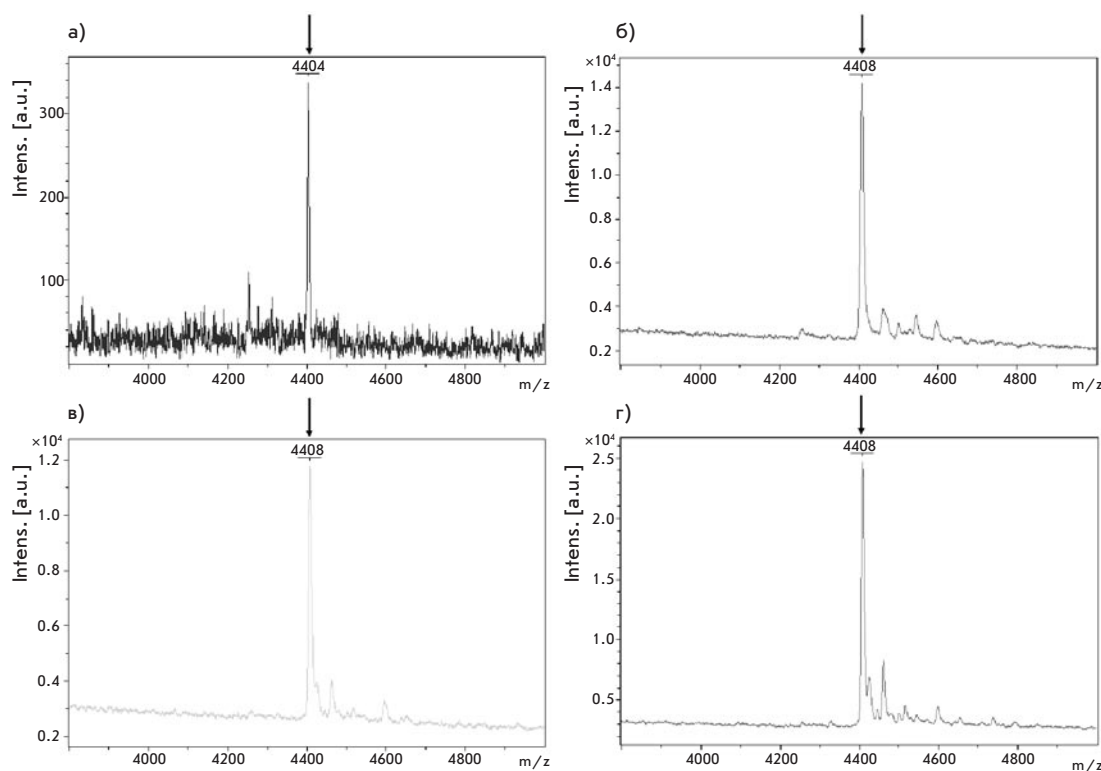


Рис. 3. Масс-спектры MALDI метилированного фрагмента ДНК, обработанного буфером для экстрактов (контроль) (а), ядерным экстрактом клеток линий CHO (б), HeLa (в), Skov3 (г)

служит первой стадией процесса деметилирования ДНК у млекопитающих. Известно, что в эмбрионах рыб вида *Danio rerio* деметилирование ДНК является многоступенчатым процессом, включающим дезаминирование 5-метилцитозина с помощью дезаминаз AID (Activation Induced deaminase)/Arobec (Apolipo-protein B RNA-editing catalytic component), удаление тимина с помощью гликозилазы MBD4 и BER-репарацию [4, 17]. В клетках млекопитающих существуют подходящие кандидаты из семейства цитозиндезаминаз – AID и Arobec1, которые коэкспрессируются с полипотентными генами в ооцитах, эмбриональных зародышевых клетках и эмбриональных стволовых клетках [18]. Однако известно, что эти ферменты осуществляют дезаминирование только в одноцепочечных РНК (Arobec1) или ДНК (AID). Кроме того, AID и Arobec дезаминируют остатки цитозина намного эффективнее, чем 5-метилцитозина. ДНК-метилтрансфераза Dnmt3b также может выполнять роль 5-метилцитозиндезаминазы в условиях низкой концентрации S-аденозилметионина (AdoMet) [19], но эта реакция проходит с очень низкой эффективностью, что делает маловероятным ее участие в глобальном деметилировании. Более того, концентрация AdoMet в клетке обычно достаточно высока.

Хорошим кандидатом на роль тимингликозилазы является гликозилаза MBD4, которая содержит метилсвязывающий и гликозилазный домен и обеспечивает удаление тимина из T/G-мисматча [20]. Хотя мыши с недостатком MBD4 жизнеспособны, у них чаще встречаются мутации в CpG-сайтах [21]. Однако MBD4 удаляет тимины из T/G-мисматчей с образованием апуриновых сайтов, которые

сразу разрезаются эндонуклеазой AP. В симметрично метилированных CpG-сайтах дезаминирование в обеих цепях ДНК должно приводить к образованию участка TG/GT. Даже если MBD4 может узнать такой участок, то после действия эндонуклеазы AP должен образоваться двойной разрыв, что привело бы к потере генетического материала. Кроме того, MBD4 удаляет урацил из U/G-мисматча быстрее, чем тимин из T/G [20].

Известен и другой механизм деметилирования ДНК, который наблюдается у растений вида *Arabidopsis thaliana* и предполагает прямое удаление основания 5-метилцитозина с помощью бифункциональных гликозилаз/лиаз (ROS1, DML2, DML3, DME) и последующую BER-репарацию [22–25]. У млекопитающих существуют две подходящие гликозилазы на эту роль: тимин-ДНК-гликозилаза (TDG) и метилсвязывающий белок MBD4. Однако и TDG, и MBD4 обладают слабой 5-метилцитозин-гликозилазной активностью по сравнению со способностью вырезать тимин [26]. Кроме того, активное деметилирование отцовского хроматина наблюдали в мышинных эмбрионах с нокаутированным геном *mbd4* [21].

Следует также сказать о других теоретически возможных механизмах деметилирования 5-метилцитозина. Это прямое удаление метильной группы с образованием цитозина и вырезание одного или более нуклеотидов, в составе которых есть 5-метилцитозин (NER-репарация). У позвоночных существуют ортологи бактериальной деметилазы (оксидоредуктазы) AlkB, осуществляющей прямое удаление метильной группы у 1-метиладенина и 3-метилцитозина в прокариотах [2]. Однако нет никаких сведений о

том, что хотя бы один из ортологов может осуществлять деметилирование 5-метилцитозина. Также бактериальной AlkB гомологично семейство гистоновых деметилаз (HDMs) [27], но ни одна из них не участвует в деметилировании ДНК. Ранее в работе [28] было показано, что метилсвязывающий белок MBD2b может непосредственно удалять метильную группу 5-метилцитозина с образованием С и метанола в качестве продуктов реакции. Однако этот результат не удалось воспроизвести в других лабораториях. Более того, мыши, лишённые MBD2b, имели нормальный фенотип и нормальный паттерн метилирования ДНК. Что касается механизма деметилирования ДНК через NER-репарацию,

то нет никаких данных, подтверждающих протекание такого процесса *in vivo*.

Таким образом, необходимо дальнейшее изучение деметилирования ДНК у млекопитающих для понимания механизма этого жизненно важного процесса. ●

*Данная работа была выполнена при содействии Благотворительного фонда поддержки научных исследований «Наука за продление жизни» и при частичной поддержке гранта РФФИ 07-04-00545. Авторы выражают благодарность д.х.н. Серебряковой М.В. за проведение MALDI MS анализов.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R, Haaf T. // Nature. 2000. V. 403. P. 501–502.
- Morgan H.D., Santos F, Green K., Dean W, Reik W. // Hum. Mol. Genet. 2005. V. 14. P. 47–58.
- Miller C.A., Sweatt J.D. // Neuron. 2007. V. 53. P. 857–869.
- Rai K., Huggins I.J., James S.R., et al. // Cell. 2008. V. 135. P. 1201–1212.
- Reiner S.L. // Hum. Mol. Genet. 2005. V. 14. P. 41–46.
- Bruniquel D., Schwartz R.H. // Nat. Immunol. 2003. V. 4. P. 235–240.
- Kersh E.N., Fitzpatrick D.R., Murali-Krishna K., et al. // J. Immunol. 2006. V. 176. P. 4083–4093.
- Northrop J.K., Thomas R.M., Wells A.D., Shen H. // J. Immunol. 2006. V. 177. P. 1062–1069.
- Vanyushin B.F., Nemirovsky L.E., Klimenko V.V., Vasiliev V.K., Belozersky A.N. // Gerontologia. 1973. V. 19. P. 138–152.
- Wilson V.L., Jones P.A. // Science. 1983. V. 220. P. 1055–1057.
- Ehrlich M. // Oncogene. 2002. V. 21. P. 5400–5413.
- Feinberg A.P., Ohlsson R., Henikoff S. // Nat. Rev. Genet. 2006. V. 7. P. 21–33.
- Wilson A.S., Power B.E., Molloy P.L. // Biochim. Biophys. Acta. 2007. V. 1775. P. 138–162.
- Kisseljova N.P., Kisseljov F.L. // Biochemistry (Mosc). 2005. V. 70. P. 743–752.
- Jones P.A., Baylin S.B. // Nat. Rev. Genet. 2002. V. 3. P. 415–428.
- Jones P.A., Laird P.W. // Nat. Genet. 1999. V. 21. P. 163–167.
- Barreto G., Schafer A., Marhold J., et al. // Nature. 2007. V. 445. P. 671–675.
- Morgan H.D., Dean W., Coker H.A., Reik W., Petersen-Mahrt S.K. // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. P. 52353–52360.
- Metivier R., Gallais R., Tiffoche C., et al. // Nature. 2008. V. 452. P. 45–50.
- Hendrich B., Hardeland U., Ng H.H., Jiricny J., Bird A. // Nature. 1999. V. 401. P. 301–304.
- Millar C.B., Guy J., Sansom O.J., et al. // Science. 2002. V. 297. P. 403–405.
- Gehring M., Huh J.H., Hsieh T.F., et al. // Cell. 2006. V. 124. P. 495–506.
- Gong Z., Morales-Ruiz T., Ariza R.R., et al. // Cell. 2002. V. 111. P. 803–814.
- Morales-Ruiz T., Ortega-Galisteo A.P., Ponferrada-Marin M.I., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 6853–6858.
- Penterman J., Zilberman D., Huh J.H., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. P. 6752–6757.
- Cortazar D., Kunz C., Saito Y., Steinacher R., Schar P. // DNA Repair (Amst.). 2007. V. 6. P. 489–504.
- Ozer A., Bruick R.K. // Nat. Chem. Biol. 2007. V. 3. P. 144–153.
- Bhattacharya S.K., Ramchandani S., Cervoni N., Szyf M. // Nature. 1999. V. 397. P. 579–583.

УДК 577.214

# Изучение молекулярных механизмов патогенеза иммуноопосредованных воспалительных заболеваний на примере псориаза

Э.С. Пирузян<sup>1\*</sup>, В.В. Соболев<sup>1</sup>, Р.М. Абдеев<sup>2</sup>, А.Д. Золотаренко<sup>1</sup>, А.А. Николаев<sup>1</sup>, М.К. Саркисова<sup>1</sup>, М.Е. Саутин<sup>1</sup>, А.А. Ишкин<sup>1</sup>, Ан.Л. Пирузян<sup>2</sup>, С.А. Ильина<sup>2</sup>, И.М. Корсунская<sup>2</sup>, О.Ю. Рахимова<sup>3</sup>, С.А. Брускин<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991, Москва, ул. Губкина, 3

<sup>2</sup> Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, 119991, Москва, ул. Косыгина, 4

<sup>3</sup> Городская клиническая больница № 24 Департамента здравоохранения г.Москвы, 127006, Москва, ул. Писцовая, 10

\*E-mail: eleopiru@vigg.ru

**РЕФЕРАТ** На примере псориаза приведены результаты биоинформационного, молекулярно-генетического и протеомного анализа путей патогенеза иммуноопосредованных воспалительных заболеваний. Идентифицированы общие клеточные процессы, характерные для патогенеза псориаза и болезни Крона. Обсуждается возможность новых подходов к лечению иммуноопосредованных воспалительных заболеваний.

**Ключевые слова:** псориаз, иммуноопосредованные воспалительные заболевания, экспрессия генов, протеомный анализ, сетевые взаимодействия генов, биоинформационный анализ.

## ВВЕДЕНИЕ

Псориаз (*Psoriasis vulgaris*, OMIM 177900) – хроническое воспалительное, рецидивирующее, иммуноопосредованное заболевание кожи с вовлечением в процесс ряда органов и систем. Псориаз является сложной генетически обусловленной патологией, в проявлении которой задействованы большие группы генов [1].

Основной клинической симптоматикой псориаза является появление четко разграниченных эритематозных бляшек, покрытых серебристо-белыми чешуйками. Пораженная кожа характеризуется эпидермальной гиперплазией и воспалением вследствие гиперпролиферации и ненормальной дифференцировки кератиноцитов, а также инфильтрации антигенпрезентирующих клеток, активации Т-хелперных клеток и освобождения провоспалительных цитокинов [1, 2]. Визуально «непораженная» (unaffected) или «невовлеченная» (uninvolved) псориазическая кожа морфологически и гистологически бессимптомна. Однако профили генной экспрессии свидетельствуют о существенных изменениях как в пораженной, так и в «непораженной» коже больного псориазом по сравнению с кожей здорового человека [3].

Полагают, что мультигенная природа псориаза связана с наличием локусов, чувствительных к проявлению за-

болевания, обозначаемых как PSORS1-PSORS9 (Psoriasis Susceptibility), расположенных, по крайней мере, на 9 хромосомах. В пределах каждой из этих областей картирован целый ряд генов-кандидатов на участие в патологическом процессе [4–6]. Кроме этого, на развитие различных форм псориаза возможно влияние еще ряда геномных локусов [7–9]. По данным на 2008 г. гены – кандидаты на развитие псориазического процесса локализованы на 10 локусах (PSORS1-PSORS10) [10]. Строгую генетическую основу наследования псориаза подтверждают результаты семейного и близнецового анализа – высокие значения наследуемости псориаза (до 80 %) и повышенная конкордантность у монозиготных близнецов (около 70 %) по сравнению с дизиготными (до 30 %) [8]. Однако, как и любое другое многофакторное заболевание, псориаз обуславливается не только генетической предрасположенностью, но и влиянием внешних факторов. Многие факторы внешней среды играют существенную роль в патофизиологии псориаза, являясь триггерами развития заболевания у генетически чувствительных (или предрасположенных) к нему индивидуумов. Провоцирующими агентами могут быть механические воздействия, травматические повреждения кожи, которые могут привести к эффекту Кебнера (возникновению очагов псориаза на месте повреждения эпидермиса), хирургиче-

ские вмешательства, УФ-облучение, повышенный индекс массы тела, избыточное употребление алкоголя и курение; различного рода стрессовые факторы, включая физиологические, холодовые и психоэмоциональные стрессы [6].

Роль инфекционной этиологии в запуске развития псориаза хорошо известна в случаях бактериальных, вирусных и грибковых инфекций [11, 12]. Лекарственные препараты, например,  $\beta$ -блокаторы [13], ингибиторы ангиотензин-конвертирующего фермента [14], антималярийные препараты [15] и литий [16], также могут провоцировать развитие заболевания. Подсчитано, что эмоциональные стрессы являются триггерами псориаза у 23 % пациентов; лекарственные препараты – у 16 %; физические травмы (феномен Кебнера) – у 43 %, инфекции в целом – у 14 % [17]. Остальные 4 %, возможно, составляют другие триггерные факторы.

Таким образом, причина псориаза остается до сегодняшнего дня неизвестной, но очевидно, что это заболевание является результатом комбинированного взаимодействия генетических факторов, факторов окружающей среды и индивидуальных особенностей индивида (подверженность психоэмоциональным стрессам, вредные привычки и т.д.). Профилирование генной экспрессии при псориазе свидетельствует о том, что псориаз является иммуноопосредованным воспалительным заболеванием, при котором дисбаланс в эпидермальной клеточной структуре, росте и дифференцировке клеток возникает из-за молекулярных стрессовых сигналов, инициирующих искаженные иммунные ответы [3].

Изучение молекулярных механизмов развития псориазического процесса проводится нами на клиническом, биоинформационном, молекулярно-генетическом и протеомном уровнях с учетом этнической компоненты у больных псориазом и результатов сравнительного анализа молекулярно-генетических основ его развития с патогенетическими путями других заболеваний многофакторной природы, в частности болезни Крона и атеросклероза.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Забор биоптатов кожи больных псориазом *Psoriasis vulgaris* (раннего типа) из пораженного и непораженного участков кожи проводили под местной анестезией с помощью дер-

матологического пробойника (4 мм). Пациенты не получали какой-либо системной или PUVA/UV терапии в течение одного месяца до взятия биопсии кожи (табл. 1). Биопсии из непораженных участков кожи брали на расстоянии около 3 см от пораженной кожи [3, 18, 19]. Исследование одобрено Локальным комитетом по этике при Институте общей генетики РАН и соответствует принципам, изложенным в декларации Хельсинкского соглашения.

Для оценки состояния псориаза использовали Индекс охвата и тяжести псориаза PASI (Psoriasis Area and Severity Index). При его расчете для каждой части тела вычисляется локальный PASI = Доля  $\times$  Охват  $\times$  (Краснота + Шелушение + Толщина). Суммарный итоговый PASI равен сумме локальных и может изменяться в диапазоне от 0 до 72. Максимальное значение индекса PASI в данной группе составило 11.4, минимальное 1.8, т.е. все больные относятся к группе с легким течением заболевания. Наличие или отсутствие сопутствующего псориазу псориазического артрита обозначено в графе PsA (табл. 1).

Забор атеросклеротических аутопсий проводили из постмортального материала. Для этого из брюшной аорты с признаками атеросклероза, из бляшек в стадии атероматоза выделяли интимальный слой. Аутопсии из визуально здоровой части сосуда в долипидной стадии извлекались по той же схеме. Забор производился у пациентов, проходивших лечение по различным диагнозам (табл. 2).

**Выделение РНК** из биопсий проводили с помощью набора компании Qiagen по протоколу производителя. Для очистки препаратов РНК от примесей ДНК проводили обработку ДНазой Qiagen®.

**Обратную транскрипцию** проводили с помощью обратной транскриптазы M-MLV (Promega) по протоколу производителя.

**ПЦР в реальном времени** проводили с использованием меченных флуоресцентными агентами олигонуклеотидных проб. Реакцию проводили с использованием реактивов компании «Евроген». Праймеры и пробы были синтезированы фирмой «ДНК-Синтез». Экспрессию генов-мишеней нормализовали на ген домашнего хозяйства GAPDH. Для анализа результатов использовались данные реакции ПЦР со следующими параметрами: эффективность реакции не менее 95 %; коэффициент корреляции не менее 0.99; наклон кривой (slope)-3.4  $\pm$  0.2. Обработку результатов полимеразной цепной реакции проводили методом 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup>, согласно [20].

Для изучения **протеомных профилей** использовались биоптаты пораженной и визуально непораженной кожи больных псориазом. Экстрагированные белки изучали методом двумерного электрофореза. Пятна на геле были визуализированы при помощи окрашивания серебром. Изображения анализировали с использованием программы Melanie III (GeneBio, Switzerland). Идентификацию белков проводили при помощи методов MALDI-TOF масс-спектрометрии и nanoLC-MS/MS масс-спектрометрии в Протеомном центре Института биомедицинской химии РАН.

**Для биоинформационных исследований** мы использовали базу данных GEO DataSets (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), в которой в виде электронных таблиц собраны результаты экспериментов по оценке уровня экспрессии

Таблица 1. Информация о пациентах

	Пол	Возраст	Тип псориаза	PASI	PsA	Наследственность
1	М	22	<i>P. vulgaris</i>	4.0	нет	Отрицает
2	М	36	<i>P. vulgaris</i>	7.2	нет	Псориаз у отца
3	М	23	<i>P. vulgaris</i>	1.8	нет	Псориаз у брата и отца
4	М	51	<i>P. vulgaris</i>	9.4	нет	Псориаз у матери
5	М	38	<i>P. vulgaris</i>	2.1	нет	Отрицает
6	М	57	<i>P. vulgaris</i>	4.2	нет	Псориаз у отца
7	М	51	<i>P. vulgaris</i>	2.1	нет	Отрицает
8	М	40	<i>P. vulgaris</i>	2.8	нет	Псориаз у отца
9	М	34	<i>P. vulgaris</i>	3.2	нет	Псориаз у матери
10	М	49	<i>P. vulgaris</i>	11.4	нет	Отрицает

Таблица 2. Патологоанатомический диагноз пациентов с атеросклерозом сосудов

Пациент	Возраст	Пол	Диагноз
1	80	ж	Дисциркуляторная энцефалопатия. Атрофия больших полушарий головного мозга, внутренняя гидроцефалия. Стенозирующий атеросклероз артерий головного мозга. Сахарный диабет 2-го типа. Склероз, липоматоз поджелудочной железы.
2	70	ж	Ишемический инфаркт правой височной доли головного мозга. Атеросклероз артерий головного мозга со стенозом просвета до 50 %. Сахарный диабет 2-го типа. Артериальная гипертония. Атеросклероз артерий сердца со стенозом просвета до 75 %.
3	77	м	Инфаркт головного мозга в бассейне средней мозговой артерии. Сахарный диабет 2-го типа. Гипертоническая болезнь 3 ст. Ишемическая болезнь сердца: атеросклеротический кардиосклероз.
4	67	ж	Хроническая язва желудка. Хроническая язва 12-перстной кишки. Диффузный мелкоочаговый кардиосклероз. Постинфарктный кардиосклероз. Атеросклероз коронарных артерий сердца со стенозом просвета на 70 %. Сахарный диабет 2-го типа. Атеросклероз мозговых артерий со стенозом их просвета на 30 %.
5	75	ж	Рак молочной железы. Флеботромбоз вен правой голени. Тромбоэмболия легочной артерии. Дисциркуляторная энцефалопатия. Атеросклероз артерий мозга со стенозом просвета на 25 %. Хронический обструктивный бронхит, диффузный сетчатый пневмосклероз, обструктивная эмфизема легких. Атрофический гастрит.
6	80	м	Крупноочаговый, постинфарктный кардиосклероз, атеросклероз коронарных артерий сердца со стенозом просвета на 75 %. Вторичная артериальная гипертония. Двусторонний пиелонефритический нефросклероз. Хроническое венозное полнокровие. Хроническая почечная недостаточность.
7	64	м	Хроническая алкогольная интоксикация. Двусторонняя нижнедолевая очагово-сливная бронхопневмония. Ишемическая болезнь сердца: атеросклероз коронарных сосудов со стенозом просвета на 40 %.
8	87	м	Крупноочаговый постинфарктный кардиосклероз. Атеросклероз коронарных артерий сердца со стенозом просвета на 50 %. Гипертония малого круга кровообращения по смешанному типу. Атеросклероз артерий головного мозга со стенозом просвета на 30–50 %.

генов на биочипах. В качестве инструмента обработки табличных данных использовали программный продукт MetaCore® компании GeneGo Inc (США). Расклад процессов по приоритетам производится программой MetaCore® исходя из того, что чем меньше значение p-value, тем больше вероятность того, что гены, попавшие в конкретный процесс, включены туда не случайно. Изначально порог для p-value мы выставляли равный 0.05.

**РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ**

**РОЛЬ ЭТНИЧЕСКОЙ КОМПОНЕНТЫ В ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К РАЗВИТИЮ ПСОРИАЗА**

В течение последних десятилетий накоплены многочисленные свидетельства того, что наряду с индивидуальными различиями в метаболизме лекарственных препаратов и в реакциях на лекарство – как в отношении их терапевтического эффекта, так и в отношении отрицательных реакций на них организма, имеются индивидуальные отличия и в предрасположенности к определенным заболеваниям. Изучение факторов индивидуальной предрасположенности человека к различным заболеваниям и индивидуального ответа пациента на применение лекарственных препаратов с учетом этнической принадлежности индивидуума было начато в 70-е годы прошлого столетия под руководством академика Л.А. Пирузяна [21, 22]. Так, отмечалась необходимость учета кинетики метаболических превращений при взаимодействии химических соединений с биообъектами [23].

Этническая компонента также играет существенную роль в развитии сложных заболеваний, в частности псориаза. В среднем 2–3 % популяции людей во всем мире болеют псориазом, однако эти данные колеблются в широком диапазоне в зависимости от различных стран, географических регионов и этнической принадлежности больных псориа-

зом [24]. Отмечается значительная географическая вариативность в частоте заболеваемости псориазом (рис. 1) [25]. Существенная разница в распространенности псориаза, в частности в Азии и в Европе, свидетельствует о четкой этнической компоненте в развитии псориаза. Таким образом, четкая регионально-этническая дифференциация в уровнях заболеваемости псориазом является очевидной [7, 8, 26]. Сведения о популяционных частотах псориаза, тем не менее, противоречивы, что может быть обусловлено применением в разных странах различных методов оценки. Для устранения противоречий в исследовании и стандартизации методов оценки распространенности заболевания, а также получения унифицированных характеристик нами была предложена Индивидуальная информационная карта (ИИК), включающая более 50 параметров [27, 28]. Проведенный нами анализ генетической структуры дагестанской выборки по данным ИИК и родословных семей показал высокую обособленность этнических групп, что является

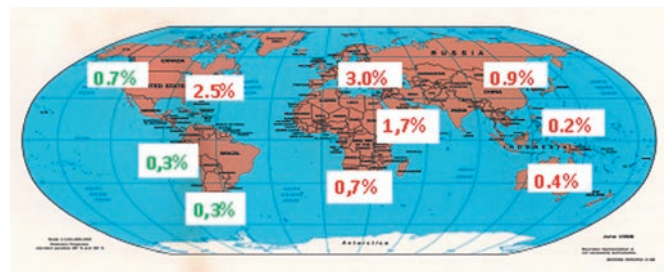


Рис. 1. Распределение частот заболеваемости псориазом в различных регионах мира [24, 25]. Зеленым цветом отмечены проценты заболеваемости псориазом у аборигенов



Рис. 2. Список 40 наиболее измененных процессов при псориазе (по мере убывания значимости) в коже больных псориазом в сравнении с кожей здоровых волонтеров (А) и 20 наиболее измененных процессов в пораженной коже больных псориазом в сравнении с непораженной кожей (Б)

результатом ограниченного числа межэтнических браков. Следствием этого является более высокая степень эндогамии, которая приводит к увеличению степени гомозиготности в популяции. Кроме этого, изученные родословные включают достаточное число многолетних семей для того, чтобы проследить за родственной структурой отдельной семьи (3–4 поколения). Так, у аварцев, даргинцев, лезгинов, лакцев, азербайджанцев и ногайцев среднее число детей в семьях составляет 3 ребенка, у кумыков, табасаранцев и агулов – 4, а в семьях русских – 1. Важно также отметить, что несколько поколений большинства семей проживают в территориальной близости и, следовательно, находятся в одних и тех же условиях внешней среды.

Проведенное нами исследование показало существенные различия в наличии осложнений и длительности заболевания в зависимости от типа псориаза (Тип I – ранний, Тип II – поздний) в различных этнических группах Дагестана. Полученные данные показали важную роль этнической компоненты в наследуемости такой сложной патологии, как псориаз, а также продемонстрировали возможность использовать ИИК и модельную популяцию Дагестана для изучения типа наследования при псориазе с учетом этнической компоненты [29].

Анализ генов предрасположенности к развитию псориаза в республиках Башкортостан и Хакасия на выборке пациентов русской, татарской, башкирской и хакасской

принадлежности показал, что полиморфные локусы генов HLA-C и HCR являются основными маркерами предрасположенности к псориазу в изученных регионах вне зависимости от формы заболевания и этнической принадлежности [30].

Для исследования распространенности псориаза и изучения профилей генной экспрессии существенным является выравнивание данных по всем изучаемым параметрам. Так, некоторые различия между профилями генной экспрессии с помощью Affimetrix-чипов у японских пациентов с псориазом и результатами, полученными тем же методом у четырех других исследовательских групп, указывают на вариабельность генной экспрессии у индивидуальных пациентов на основе их возраста, этнической принадлежности, пола и воздействия факторов окружающей среды [3, 31, 32, 33, 34].

**АНАЛИЗ ДАННЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ МИКРОЧИПОВ**

В настоящее время стали широко использоваться программные продукты, позволяющие концентрировать и систематизировать большие объемы генетической информации, выстраивать гипотезы генных сетевых взаимодействий. Одной из таких программ является программный продукт MetaCore® компании GeneGo Inc. (США). В результате информационного анализа экспрессии около 12 000 генов на биологических микрочипах с помощью программы MetaCore® нами было установлено, что число генов, изменивших свою экспрессию более чем в 1.5 раза при псориазе, составляет 7563 [35]. На рис. 2 нами представлены списки измененных при псориазе процессов. Основными измененными процессами в коже при псориазе являются иммунный ответ, клеточный цикл, воспаление, пролиферация и др. В процессе развития заболевания задействован ряд иммунных клеток, таких как Т-лимфоциты (Th1, Th17), антигенпрезентирующие клетки (АРС) – дендритные клетки, клетки Лангерханса, макрофаги и естественные киллеры (NK) [36]. Передачу сигнала между собой они осуществляют благодаря сигнальным молекулам – цитокинам и непосредственным взаимодействием различных рецепторов с лигандами. Так, например, рецепторы TLR (Toll-like receptors) принадлежат к семейству рецепторов, вызывающих иммунный ответ на микробное или вирусное воздействие. Эти рецепторы экспрессируются не только на иммунных клетках (моноциты, макрофаги, дендритные клетки и гранулоциты), но и на клетках эпителия дыхательных путей и кожи – важных участках взаимодействия хозяина и патогена [37]. В семейство TLR входят 11 рецепторов, а их лигандами являются липопротеины, одноцепочечная или двуцепочечная РНК, липополисахариды, флагеллин, неметилированная ДНК [38]. После стимуляции данных рецепторов они активируют целый комплекс сигнальных каскадов, в состав которых входят три группы белков: NF- $\kappa$ B/Rel, IRF и MAPK – ERK, JNK и p38. Так, MAPK индуцирует экспрессию семейства AP-1 транскрипционных факторов, таких как Fos и Jun, и активирует транскрипционную активность белков комплекса AP-1, запуская различные процессы, приводящие к воспалению [39]. В результате индуцируется экспрессия провоспалительных цитокинов (IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-12 и TNF- $\alpha$ ), а так-

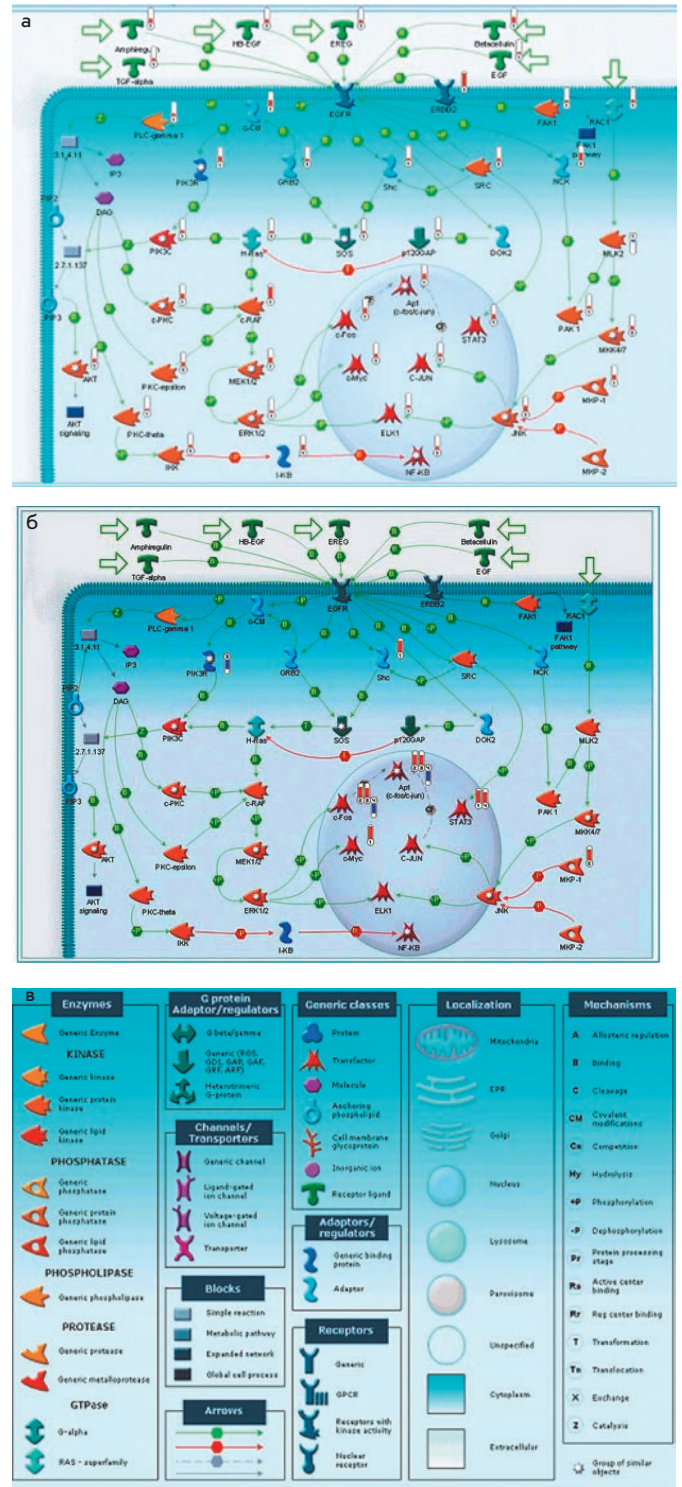


Рис. 3. Путь передачи сигнала от EGF (Epidermal Growth Factor) к AP-1 и изменение экспрессии некоторых генов, отвечающих за данный процесс в коже при псориазе (а – в коже больных по сравнению с кожей здоровых волонтеров, б – в пораженной коже по сравнению с непораженной кожей больных псориазом, в – условные обозначения). На картах используются также обозначения, характеризующие степень изменения уровня экспрессии того или иного гена: столбик вниз (↓) обозначает уменьшение экспрессии, столбик вверх (↑) – увеличение экспрессии

же костимулирующих молекул, таких как CD80 и CD86, активирующих иммунный ответ [40, 41]. Учитывая то, что вирусы и бактерии являются одними из основных триггеров псориаза, эти рецепторы выполняют важную роль в инициации заболевания [38, 42].

Из всего обширного семейства рецепторов хемокинов при псориазе высокий уровень экспрессии отмечен у CCR4, CCR5, CCR6, CCR10, CXCR3. Хемокины принадлежат к группе провоспалительных цитокинов и обеспечивают приток клеток Th1 в участки воспаления [43]. Экспрессия рецепторов CCR4 и CCR10 характерна для CD4+ и CD8+ Т-клеток памяти с CLA+ фенотипом (cutaneous lymphocyte antigen), который определяет миграцию лимфоцитов в лимфатические узлы [44]. У рецептора CCR4 лиганд CCL17 экспрессируется на эндотелии сосудов дермы и совместно с лигандом CCL27 обеспечивает миграцию лейкоцитов в кожу [45]. У рецептора CCR10 повышение конститутивного уровня экспрессии лиганда CCL27 отмечено на кератиноцитах под воздействием провоспалительных цитокинов IL-1 и TNF-α. Таким образом, взаимодействие CCR10–CCL27 вовлекает Т-клетки в воспалительный процесс кожи [46]. Механизм регуляции экспрессии хемокинов можно наблюдать на примере CXCL16 при атеросклерозе. Экспрессия данного хемокина индуцируется посредством IL-18 через сигнальный путь: MyD88 → IRAK1-IRAK4-

TRAF6 (tumor necrosis factor receptor – associated factor 6) → c-Src → PI3K → Akt → JNK → AP-1 [47].

Как видно из этих данных, общим звеном сигнальных путей регуляции TLR-рецепторов и хемокинов является транскрипционный фактор AP-1.

### АНАЛИЗ СЕТЕВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ГЕНОВ ПРИ ПСОРИАЗЕ

Особенности взаимодействий различных генов при псориазе можно рассматривать на примере передачи сигнала от рецептора EGF (Epidermal Growth Factor) внутрь клетки, что продемонстрировано на рис. 3, а и б. Из обоих рисунков видно, что гены, кодирующие транскрипционные факторы, такие как c-Fos, c-Myc, c-Jun и ELK1, активируются путем передачи сигнала от EGFR через GRB2 и Shc к SOS, а затем через путь h-Ras → c-RAF → MEK1/2 → ERK1/2 → транскрипционные факторы. Несмотря на то что уровень экспрессии изменяется только у некоторых генов, кодирующих соответствующие медиаторы сигнала (GRB2, Shc, SOS, h-Ras, c-RAF, MEK1/2), как, например, у c-RAF (рис. 3, а), экспрессия транскрипционных факторов c-Fos, c-Myc, c-Jun, ELK1 и STAT3 оказалась значительно выше в случае пораженной кожи по сравнению с непораженной кожей больных псориазом, чем в коже больных по сравнению с кожей здоровых волонтеров [35].

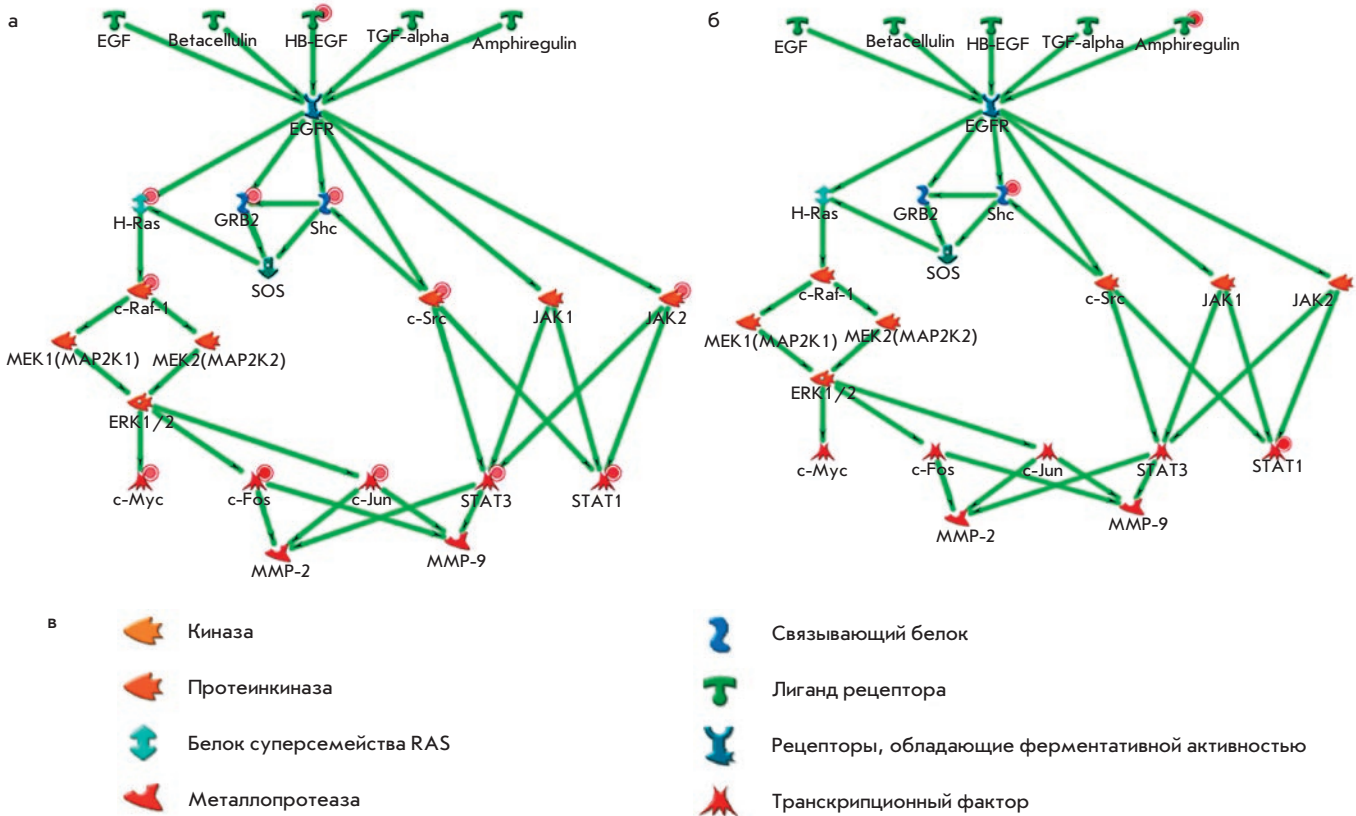


Рис. 4. Степень изменения экспрессии генов сигнального пути EGF в коже больных псориазом: а) по сравнению с кожей здоровых людей; б) в пораженной коже по сравнению с фенотипически нормальной кожей тех же пациентов; в) условные обозначения. Повышенная экспрессия генов показана при помощи красных кружков возле символов объектов. Оттенок красного зависит от конкретного значения изменения уровня экспрессии (чем больше изменение, тем насыщеннее оттенок)



На рис. 4 отражена степень изменения экспрессии генов сигнального пути EGF в коже больных псориазом. Мы сравнили пороговое изменение (Fold Change) генной экспрессии в псориазных бляшках относительно нормальной кожи (рис. 4, а) и фенотипически здоровой кожи некоторых пациентов (рис. 4, б). Пороговое изменение экспрессии (FC) установлено как 2. Рисунки 4, а и 4, б демонстрируют некоторые сетевые белок-белковые взаимодействия, входящие в состав сигнальных путей, запускаемых эпидермальным фактором роста (EGF) и его лигандами. Зеленые стрелки показывают последовательную активизацию белковых взаимодействий, происходящую либо через связывание, либо через фосфорилирование. Можно отметить, что экспрессия некоторых EGFR-лигандов повышена в коже, пораженной псориазом (Hb-EGF и амфирегулин – увеличение экспрессии в 5.77 и 4.96 раза соответственно). Рисунок 4, а показывает, что каждый ген, кодирующий каждый из белков сигнального пути, апрегулирован, например, c-Raf киназа с FC = 4.46 и c-Src с FC = 3.96. Более того, сами по себе транскрипционные факторы оказались значительно апрегулированы. Так, экспрессия c-Myc повышена в 6, 15; c-Jun – в 3.35; STAT1 – в 17; STAT3 – в 6.1 и c-Jun – в 34 раза. Общая картина изменений генной экспрессии на рис. 4, б является наиболее четкой – показана только апрегуляция STAT3 в 8.6 раза. Вышеупомянутый рисунок позволяет заключить, что клетки, задействованные в патологическом процессе, характеризуются значительным изменением в уровне экспрессии, вовлекая в процесс множество молекулярных путей и связанных с ними транскрипционных факторов. Сверхэкспрессия последних заслуживает особого внимания ввиду того, что в нормальном состоянии транскрипционные факторы не проявляют таких резких изменений уровня экспрессии. Невовлеченная, т.е. визуально нормальная, кожа больных псориазом находится в промежуточном состоянии между нормой (кожей здорового индивида) и состоянием воспаления (псориазная бляшка), поскольку разница между образцами пораженной кожи и визуально непораженной

кожи больного псориазом хотя и является существенной, но намного менее выраженной, чем различия между пораженной кожей больного псориазом и кожей здорового индивида.

Проанализировав карты генных взаимодействий при псориазе, мы пришли к выводу, что во всех исследуемых процессах в качестве основных транскрипционных факторов, изменивших свою экспрессию при псориазе, присутствуют только компоненты транскрипционного фактора AP-1 и транскрипционного фактора NF-kB. Фактор NF-kB, как известно, активируется при иммунных ответах. В данной работе мы рассматривали роль компонентов именно транскрипционного фактора AP-1 [48].

### ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ АНАЛИЗ

Большой интерес для нас представляло сравнение уровней экспрессии генов в пораженной части кожи больных псориазом по отношению к экспрессии тех же генов в визуально непораженной части кожи, находящейся на расстоянии не более 3 см от пораженной кожи одного и того же больного псориазом. Такое сравнение, принятое и в ряде зарубежных лабораторий [3, 18, 19], позволяет максимально исключить влияние побочных факторов на чистоту эксперимента. Для всех генов был установлен порог изменения уровней экспрессии, равный 2. На основании произведенного нами анализа литературных данных и баз данных мы идентифицировали ряд генов, которые представляются важными для экспериментального исследования. В число этих генов входят гены, кодирующие транскрипционный фактор AP-1 (C-JUN, JUNB, JUND, C-FOS, FOSB, FRA-1, FRA-2 и др.).

Используя метод полимеразной цепной реакции в реальном времени, нами был проведен анализ уровня экспрессии 12 генов в пораженной псориазом коже в сравнении с визуально непораженной у одного и того же пациента (данные не приведены). Результаты проведенного эксперимента показали, что практически у всех больных экспрессия более чем в 2 раза в пораженной псориазом коже в сравнении с визуально непораженной стабильно увеличена только

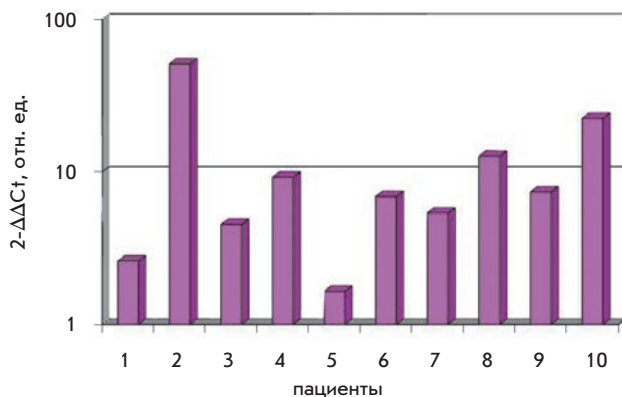


Рис. 5. Изменение экспрессии гена FRA-1 в пораженной псориазом коже относительно визуально непораженной кожи одних и тех же пациентов (1 – отсутствие изменения экспрессии; < 1 – уменьшение экспрессии в пораженных образцах; > 1 – увеличение экспрессии в пораженных образцах)

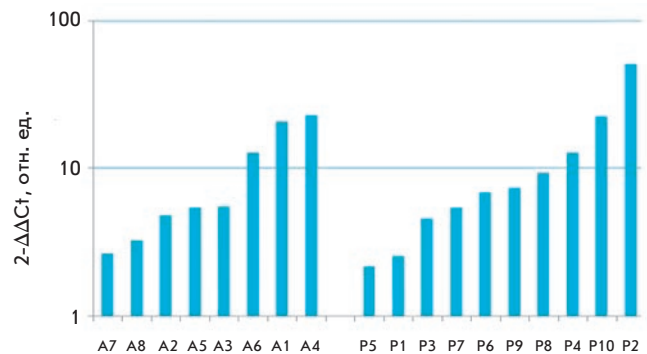


Рис. 6. Изменение экспрессии гена FRA-1 в пораженных атеросклерозом сосудах по сравнению с визуально непораженными (A1–A8), и пораженной псориазом коже по сравнению с непораженной (P1–P10): 1 – отсутствие изменения экспрессии; < 1 – уменьшение экспрессии в пораженных образцах; > 1 – увеличение экспрессии в пораженных образцах

у гена *FRA-1* (рис. 5). Все остальные гены отличались разнонаправленной экспрессией.

Для сравнения нами был проведен анализ уровня экспрессии гена *FRA-1* в образцах, полученных от больных атеросклерозом.

Результаты, полученные с помощью метода ПЦР в реальном времени, свидетельствуют об увеличении экспрессии гена *FRA-1* у всех пациентов, как в пораженной атеросклерозом части сосуда, так и в пораженной псориазом коже (рис. 6). В свою очередь, патологическая активация экспрессии гена *FRA-1*, как компонента транскрипционного комплекса AP-1, может приводить к усилению экспрессии гена *IL-2* и последующей стимуляции аутореактивных цитотоксических Т-лимфоцитов, повышению выработки провоспалительных цитокинов и аутоантител и, в конечном итоге, усиливать развитие местного воспалительного процесса, что является общей чертой в формировании и развитии псориазических и атеросклеротических бляшек [49, 50]. Повышенная экспрессия гена *FRA-1* также может приводить к усилению экспрессии гена *IL-18*, который, в свою очередь, индуцирует транскрипцию и экспрессию MMP9 (matrix metalloproteinase 9) и стимулирует продукцию активной формы MMP9. Данная стимуляция приводит к усилению миграции гладкомышечных клеток, что является одним из важных этапов образования атеросклеротической бляшки [51]. Таким образом, можно сделать вывод о возможной ключевой роли гена *FRA-1* в патогенезе псориаза и атеросклероза.

Таким образом, с помощью биоинформационных исследований были проанализированы генные сети псориаза на наличие относительно замкнутых подпроцессов и выделены основные гены – регуляторы транскрипционного комплекса AP-1. Транскрипционное профилирование псориаза на основе РНК 6 отобранных для анализа генов (*C-JUN*, *JUNB*, *JUND*, *C-FOS*, *FRA-1* и *FRA-2*) показало разнона-

правленную разрегулированность этих генов при псориазе (данные не приведены). Среди изученных генов, кодирующих белки комплекса AP-1, ген *FRA-1* выделяется устойчивой сверхэкспрессией (что отражено на рис. 5). Более того, изменение экспрессии этого гена до и после лечения выявило четкую тенденцию к снижению уровня мРНК этого гена после успешного лечения, что совпадало с положительной динамикой состояния больных (данные не представлены). Следовательно, транскрипционная активность гена *FRA-1* комплекса AP-1 может являться своего рода индикатором эффективности лечения на молекулярном уровне.

### ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ

Конечной целью наших исследований является изучение изменений в метаболических путях, которые приводят к патогенезу, поскольку именно на этом уровне могут быть выявлены новые мишени для лекарственных препаратов и разработаны новые подходы к фармакотерапии.

С помощью протеомного анализа образцов псориазической кожи нами были установлены 10 маркерных белков, присутствующих только в пораженной коже и отсутствующих в непораженной коже у больных псориазом (табл. 3) [52]. Среди них наибольший интерес представляли белки нескольких семейств.

S100 семейство включает в себя не менее 13 белков, а гены, их кодирующие, локализованы в виде кластера на 1-й хромосоме (1q21), что совпадает с локусом чувствительности к псориазу PSORS4. Известно, что этот белок сильно экспрессирован в пораженной псориазом коже, однако в настоящее время этот ген не рассматривается как ген – кандидат на развитие псориазического процесса. Точная функция белка на данный момент неизвестна.

Белки SCCA1 и SCCA2 принадлежат к семейству ингибиторов сериновых протеиназ. В работе [53] показано,

Таблица 3. Идентифицированные белки, различающиеся в пораженной и непораженной псориазом коже [52]

Пятно, номер	Название белка	%Vol	
		Пораженная кожа	Непораженная кожа
1	Кератин 17	1.97 ± 0.92	0.18 ± 0.06
	Кератин 14		
	Кератин 16		
2	SCCA2/SCCA1	0.28 ± 0.09	0.066 ± 0.02
3	Антиген чешуйчатой клеточной карциномы; SCC antigen	0.35 ± 0.18	0.03 ± 0.01
4	Енолаза 1	0.87 ± 0.22	0.40 ± 0.14
5	Супероксиддисмутаза [Mn]	0.22 ± 0.03	0.11 ± 0.02
6	Галлектин 7; Gal-7	1.14 ± 0.41	0.19 ± 0.01
7	Белок S100-A9	0.54 ± 0.03	0
8	Белок S100-A9	0.15 ± 0.07	0
9	Белок S100-A7 (Псориазин, Psoriasin)	0.51 ± 0.16	0
10	Белок S100-A7 (Псориазин, Psoriasin)	1.36 ± 0.37	0.02 ± 0.03

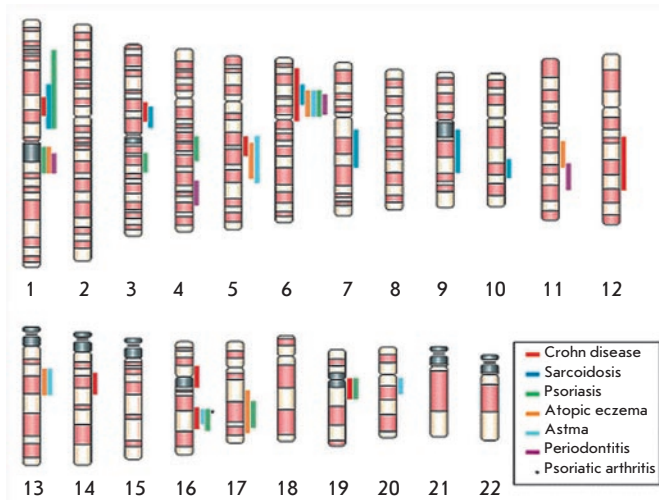


Рис. 7. Локализация групп сцепления генов, ответственных за развитие ряда воспалительных барьерных заболеваний, на различных участках хромосом [55]

что белок SCCA1 экспрессируется в нормальной коже, при псориазе его экспрессия увеличена приблизительно в 2 раза.

Белок SCCA2 в норме не обнаруживается, а при псориазе наблюдается его экспрессия на уровне, сопоставимом с уровнем экспрессии SCCA1.

Данные белки могут рассматриваться как потенциальные мишени действия фармакологических препаратов при лечении псориаза [54]

### СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПАТОГЕНЕЗА ПРИ ПСОРИАЗЕ И БОЛЕЗНИ КРОНА

Многоплановое изучение молекулярных механизмов патогенеза при псориазе может рассматриваться как модель для изучения путей патогенеза других иммуноопосредованных воспалительных заболеваний (IMID – Immune-mediated inflammatory disorders), которые характеризуются острыми или хроническими воспалительными состояниями, чаще несколькими. Наиболее распространенными IMID-фенотипами являются болезнь Крона, анкилозный спондилит, ревматоидный артрит, псориаз, увеит, псориатический артрит. Центральную роль в этих, на первый взгляд различных, заболеваниях играет цитокин TNF- $\alpha$  (фактор некроза опухолей альфа). На рис. 7 приведена локализация групп сцепления генов, ответственных за развитие этих заболеваний [55]. Болезнь Крона и язвенный колит являются хроническими, рецидивирующими заболеваниями, обозначаемыми как воспалительные кишечные заболевания IBD (inflammatory bowel disease). Результаты близнецовых исследований и увеличение частоты воспалительных заболеваний кишечника уже в первой степени родства пробандов указывают на генетическую основу этих заболеваний. Стремительное возрастание количества таких больных в Европе и Северной Америке, начиная со

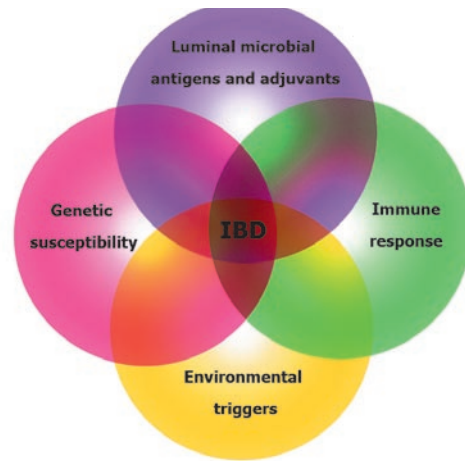


Рис. 8. Взаимодействие различных факторов (генетическая предрасположенность, антигены, иммунный ответ, факторы внешней среды), вызывающих хронический воспалительный процесс в кишечнике [56]

второй половины 20-го столетия, свидетельствует о сильном влиянии факторов внешней среды при относительно низком уровне конкордантности у монозиготных близнецов (~ 50 % для болезни Крона и 10 % для язвенного колита). Хотя работы на животных дают некоторые представления о патогенезе, этиология болезни Крона, тем не менее, остается загадкой [55, 56].

Наиболее широко распространенной гипотезой о патогенезе IBD является существование отягощенных T-клеточных иммунных ответов у генетически предрасположенных индивидов на определенные патогенные энтеробактерии и определенные факторы внешней среды, ускоряющие начало или реактивацию заболевания. На рис. 8 показано включение четырех отдельных компонентов, сочетание которых на различных этапах развития болезни необходимо для ее клинического проявления. Значительный вклад в расшифровку молекулярных механизмов патогенеза при болезни Крона, на наш взгляд, может внести сравнительное изучение генетических факторов, вовлеченных в патогенетические пути при псориазе и болезни Крона. Проведенный нами сравнительный биоинформационный анализ на основании обработки данных биологических микрочипов базы данных GEO Data Sets позволил составить общий список генов и измененных клеточных процессов для обоих заболеваний.

### ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ, ИЗМЕНИВШИХ ЭКСПРЕССИЮ ПРИ ДВУХ ПАТОЛОГИЯХ – ПСОРИАЗЕ И БОЛЕЗНИ КРОНА

Наш анализ был направлен на выявление списков дифференциально экспрессированных генов в каждом наборе данных по отдельности и дальнейшее сравнение этих списков на системном уровне. Такой подход к анализу диктуется свойствами экспрессионных данных (высокий уровень шума, большой объем анализируемых данных)

Таблица 4. Список генов, общих для патогенеза псориаза и болезни Крона [56]

Ген	Идентификационный номер	Локализация	Ген	Идентификационный номер	Локализация
GNA15	2769	19p13.3	CBX3	11335	7p15.2
GPM6B	2824	Xp22.2	UGT1A6	54578	2q37
IFI44	10561	1p31.1	DEGS1	8560	1q42.11
OAS2	4939	12q24.2	PSME2	5721	14q11.2
FOXC1	2296	6p25	TRAK2	66008	2q33
ZNF207	7756	17q11.2	DNAJC7	7266	17q11.2
IFI35	3430	17q21	CSNK1D	1453	17q25
STAT3	6774	17q21.31	TRIM22	10346	11p15
TXNDC1	81542	14q22.1	IRF9	10379	14q11.2
MRPL9	65005	1q21	UBE2L6	9246	11q12
CASP4	837	11q22.2-q22.3	ETS2	2114	21q22.2
MECP2	4204	Xq28	QPCT	25797	2p22.2
LONRF1	91694	8p23.1	SFPQ	6421	1p34.3
CG018	90634	13q12-q13	UGT1A4	54657	2q37
VKORC1	79001	16p11.2	H2AFY	9555	5q31.3-q32
MIB1	57534	18q11.2	HMG1	3150	21q22.2
RFK	55312	9q21.13	CTSC	1075	11q14.1-q14.3
SOSTDC1	25928	7p21.1	SERPINB5	5268	18q21.3
KIAA1033	23325	12q24.11	IER2	9592	19p13.13
SYNCRIP	10492	6q14-q15	S100A8	6279	1q21
RARG	5916	12q13	ARMET	7873	3p21.1
DDOST	1650	1p36.1	FGFR2	2263	10q26
CDC42EP1	11135	22q13.1	RBPMS	11030	8p12-p11
S100A9	6280	1q21	JUNB	3726	19p13.2
PHGDH	26227	1p12			

и свойствами конкретных сетей данных, взятых для анализа (они выполнены на различных типах микрочипов, содержащих различное количество проб, и поэтому не могут сравниваться напрямую) [57].

Набор данных по **псориазу** исходно содержал информацию об уровне экспрессии 12 626 проб для восьми экспериментов (4 образца пораженной кожи и 4 образца здоровой кожи тех же пациентов). После отсева проб с плохо детектированной экспрессией размер данных сократился до 5076 проб. Размер списка проб со статистически значимыми отличиями в экспрессии между пораженной и здоровой тканью составил 410 проб при уровне значимости 0.1.

Набор данных по **болезни Крона** содержал информацию об уровне экспрессии 24 016 проб для 21 эксперимента (10 образцов эпителия кишечника здоровых индивидуумов и 11 образцов пораженного эпителия). Размер списка проб со статистически значимыми отличиями в экспрессии между пораженной и здоровой тканью составил 3850 проб при уровне значимости 0.1. Такое большое различие в размерах списков генов связано с тем, что алгоритм контроля уровня ошибок 1-го рода (FDR) зависит от размера входного набора. Чем больше генов в исходном списке, тем больше генов, при одинаковом распределении *p*-value, пройдут контроль FDR; в нашем случае число анализируемых проб в наборе данных по болезни Крона превосходит таковое для псориаза почти пятикратно.

Полученные списки дифференциально экспрессированных генов были загружены в MetaCore®. Поскольку микрочипы содержат пробы не только для генов, но и для большого количества EST с неопределенной функцией, на этом этапе размеры списка генов изменились за счет того, что не все пробы имеют соответствующий ген в базе данных MetaCore®, и за счет того, что некоторые пробы соответствуют более чем одному гену. Размер списков распознанных генов составил 425 генов для псориаза и 2033 для болезни Крона.

Размер пересечения этих списков генов оказался равным 49, что является достаточно значимым пересечением (*p*-value =  $4.94 \cdot 10^{-2}$ ). Оценка значимости производилась при помощи теста Фишера; за полную выборку генов принято множество из 9017 генов, присутствующих в обоих исследованных массивах данных (идентификация этого множества генов проводилась при помощи сопоставления полных списков генов для обоих микрочипов в MetaCore®). Списки генов с измененной экспрессией также были сокращены до подмножества генов, присутствующих в обоих массивах данных.

Таким образом, для дальнейшего анализа были выбраны именно эти 49 генов, представленных в *табл. 4*. Представляло интерес определить, с какими молекулярно-генетическими процессами в клетках ассоциированы «общие» гены псориаза и болезни Крона. С помощью про-

граммных методов MetaCore® в табл. 5 сведены наиболее вероятные клеточные процессы с участием генов, представленных в табл. 4. Процессы, представленные в табл. 5, можно подразделить на участвующие в воспалении и в регуляции клеточного цикла. Действительно, как при псориазе, так и при болезни Крона основным патологическим очагом является очаг воспаления. Клеточный цикл и апоптоз существенно нарушены при псориазе. Кератиноциты в очаге воспаления благодаря усиленной пролиферации не успевают уходить в апоптоз, формируя бляшки на коже. Подобные процессы происходят и в кишечнике пациентов с болезнью Крона.

**ДОКАЗАТЕЛЬНАЯ ФАРМАКОТЕРАПИЯ ПСОРИАЗА И ВОЗМОЖНЫЕ НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ЛЕЧЕНИЮ ИММУНОПОСРЕДОВАННЫХ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

Псориаз считается до настоящего времени рецидивирующим и неизлечимым заболеванием, лечение его направлено на увеличение периодов ремиссии и на снижение тяжести протекания болезни. Используемые препараты (циклоsporин, системные ретиноиды, фумараты) или малоэффективное лечение метотрексатом приводят лишь к временному улучшению состояния пациента. Тем не менее наметились новые подходы к лечению псориаза. Новые терапевтические агенты характеризуются более специфическим воздействием на определенные молекулы-мишени, являющиеся ключевыми факторами формирования патологических процессов при псориазе. К ним относятся модификаторы биологического ответа, такие, например, как алекапепт, эфализумаб, этарнецепт, инфликсимаб, адалимумаб, воздействующие на специфические молекулярные посредники, вовлеченные в иммунопатогенез псориаза (рецепторы и лиганды). Так, подавление активности TNF $\alpha$ , ключевого цитокина во врожденных иммунных ответах, в т.ч. и при псориазе, осуществляется тремя основными ингибиторами TNF $\alpha$  (алекапепт, этарнецепт и инфликсимаб). Этарнецепт представляет собой димерный белок, состоящий из лиганд-связывающего фрагмента рецептора TNF, связанного с Fc-фрагментом IgG1. Он связывает TNF и блокирует его взаимодействие с рецепторами на поверхности клеток, уменьшая воспалительный процесс. Инфликсимаб – человеческие моноклональные антитела к TNF $\alpha$ , связывающие и уменьшающие активность TNF $\alpha$ , что снижает выброс IL-1 и IL-6 [58]. Таким образом, новая генерация биологических подходов к лечению псориаза обозначается как адресное поражение мишеней, специфичных для опосредованных T-клетками патогенетических процессов.

Многочисленные примеры успешного лечения псориаза и псориатического артрита биомодификаторами приведены в ряде работ, начиная с 2001 г. [58, Abstract book of Third EAD International Spring Symposium, Sofia, 2005]. При болезни Крона уровень TNF $\alpha$  повышен в слизистых оболочках кишечника, поэтому ингибиторы TNF $\alpha$  применяются и при лечении данного заболевания. Такая монотерапия биомодификаторами применяется и для лечения спондилоартропатии, ревматоидного артрита [59, 60]. Тем не менее накапливаются сведения о парадоксальных побочных реакциях в ответ на анти-TNF $\alpha$  терапию, в част-

Таблица 5. Общие клеточные процессы, характерные для псориаза и болезни Крона [56]

Процессы	P-value
Воспаление: сигнальные пути интерферона	2.19E-03
Передача сигнала: сигнальные пути WNT	1.20E-02
Регуляция инициации трансляции	5.66E-02
Морфогенез кровеносных сосудов	9.76E-02
Репарация ДНК	1.17E-01
Воспаление: сигнальные пути амфотерина	1.19E-01
Протеолиз, обусловленный клеточным циклом и апоптозом	1.29E-01
Интерлейкиновая регуляция клеточного цикла в фазе G1-S	1.29E-01
Передача сигнала: сигнальные пути андрогенового рецептора	1.34E-01

ности, отмечается развитие псориатических пустулезных и эритематозных поражений на коже некоторых пациентов с болезнью Крона [60, 61, 62]. Поскольку точный механизм таких серьезных осложнений в ответ на анти-TNF $\alpha$  терапию остается неясным, необходимо дальнейшее накопление клинических данных и исследование такой ассоциации на молекулярно-генетическом уровне.

Итак, основной целью работ по расшифровке путей патогенеза иммуноопосредованных воспалительных заболеваний на молекулярном уровне становится выявление новых мишеней для фармакологического действия. Проводимое нами в настоящее время сравнительное изучение протеомных профилей пораженной псориазом кожи и пораженных болезнью Крона фрагментов кишечника позволит выявить основные общие потенциальные мишени для фармакотерапии и согласовать полученные данные с результатами проведенного нами мета-анализа путей развития этих двух иммуноопосредованных воспалительных заболеваний.

На примере псориаза показана необходимость интегрального подхода к расшифровке этапов патогенеза, заключающегося в анализе общеклинических, биоинформационных, метаболических и генетических данных, который будет способствовать разработке простых методов для индивидуальной характеристики патогенеза и выбору наиболее эффективной тактики фармакотерапии каждого индивидуума. Таким образом, псориаз, являясь типичным сложным заболеванием, может рассматриваться как адекватная модель для изучения механизмов патогенеза аналогичных по своей сложности и многофакторности социально-значимых заболеваний человека. ●

*Работа финансирована в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» (ГК 02.512.11.2042), а также Президиумом Российской Академии наук в рамках Программы «Фундаментальные науки – медицине».*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lowes M.A., Bowcock A.M., Krueger J.G. Pathogenesis and therapy of psoriasis. // *Nature*. 2007. V. 445 P. 866–873.
2. Bowcock A.M. and Krueger J.G. Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis. // *Nat. Rev. Immunol.* 2005. V. 5. P. 699–711.
3. Kulsky J.K., Kenworthy W., Bellgard M. et al. Gene expression profiling of Japanese psoriatic skin reveals an increased activity in molecular stress and immune response signals // *J. Mol. Med.* 2005. V. 85. P. 964–975.
4. Barker J. N. Genetic aspects of psoriasis. // *Clin. Exp. Dermatol.* 2001. V. 26. № 4. P. 321–5.
5. Prinz J.C. Psoriasis vulgaris—a sterile antibacterial skin reaction mediated by cross-reactive T cells? An immunological view of the pathophysiology of psoriasis. // *Clin. Exp. Dermatol.* 2001. V. 26. № 4. P. 326–32.
6. Bowcock A.M. and Cookson W.O. The genetics of psoriasis, psoriatic arthritis and atopic dermatitis. // *Hum. Mol. Genet.* 2004. V. 13. № 1. P. R43–55.
7. Asumalahti K., Veal C., Laitinen T. et al. Psoriasis Consortium. Coding haplotype analysis supports HCR as the putative susceptibility gene for psoriasis at the MHC PSORS1 locus. // *Hum. Mol. Genet.* 2002. V. 11. P. 589–597.
8. Sahoo G.S., Cork M.J., Patel R. et al. Genome-wide studies of psoriasis susceptibility loci: a review. // *Journal of Dermatological Science.* 2004. V. 35. P. 171–179.
9. Fun X., Yang S., Huang W. et al. Fine mapping of the psoriasis susceptibility locus PSORS1 support HLA-C as the susceptibility gene in the Han Chinese population. // *PLoS Genet.* 2008. V. 4. P. 1–10.
10. Duffin K.C., Chandran V., Krueger G.G. et al. Genetics of Psoriasis and Psoriatic Arthritis: update and future direction (GRAPPA 2007) // *J. Rheumatology.* 2008. V. 35. № 7. P. 1449–1453.
11. Duvic M., Johnson T.M., Rapini R.P. et al. Acquired immunodeficiency syndrome-associated psoriasis and Reiter's syndrome. // *Arch. Dermatol.* 1987. V. 123. P. 1622–1632.
12. Swerlick R.A., Cunningham M.W., Hall N.K. Monoclonal antibodies cross-reactive with group A streptococci and normal and psoriatic human skin. // *J. Invest. Dermatol.* 1986. V. 87. P. 367–371.
13. Gold M.H., Holy A.K., Roenigk H.H. Jr. Beta-blocking drugs and psoriasis. A review of cutaneous side effects and retrospective analysis of their effects on psoriasis. // *J. Am. Acad. Dermatol.* 1988. V. 19. P. 837–841.
14. Wolf R., Tamir A., Brenner S. Psoriasis related to angiotensin-converting enzyme inhibitors. // *Dermatologica.* 1990. V. 181. P. 51–53.
15. Baker H. Psoriasis – clinical features. // *Br. Med.* 1971. V. 3. P. 231–233.
16. Lazarus G.S., Gilgor R.S. Psoriasis, polymorphonuclear leukocytes, and lithium carbonate. An important clue. // *Arch. Dermatol.* 1979. V. 115. P. 1183–1184.
17. Asumalahti K. Molecular genetics of psoriasis. // *Helsinki university biomedical dissertation.* № 27. 2003.
18. Sonkoly E., Wei T., Janson P.C., Saaf A. et al. MicroRNAs: novel regulators involved in the pathogenesis of Psoriasis? // *PLoS ONE.* 2007. V. 2. № 7. P. 1–8.
19. Yao Y., Richman L., Morehouse C. et al. Type I Interferon: Potential Therapeutic Target for Psoriasis? // *PLoS One.* 2008. V. 3. № 7. e2737. P. 1–14
20. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. // *Methods.* 2001. V. 25. № 4. P. 402–408.
21. Подымов В.К., Гладких С.П., Мыскин В.С., Пирузян Л.А. Полиморфизм по N-ацетилтрансферазе у больных красной волчанкой. // *Проблемы изыскания, исследования и производства новых лекарственных средств.* Швиеса, Каунас, 1979. С. 52–53.
22. Пирузян Л.А. Метаболический паспорт человека – основа новой стратегии в фармакологии. // *Вестник РАН.* 2004. Т. 74. С. 610–618.
23. Пирузян Л.А. О фармакологической метрологии. // *Изв. АН СССР. Сер. биол.* 1990. № 2. С. 302–303.
24. Gudjonsson J.E., Elder J.T. Psoriasis: epidemiology. // *Clinics in Dermatology.* 2007. V. 25. P. 535–546.
25. Пирузян А.Н., Абдеев Р.М., Саркисова М.К. Роль фармакогенетики и фармакогеномики в дерматологии. // *Клиническая дерматология и венерология.* 2005. № 3. С. 8–13.
26. Bowcock A.M. The genetics of psoriasis and autoimmunity. // *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2005. V. 6. P. 93–122.
27. Пирузян А.Н. Докторская диссертация. 2005. С. 352.
28. Пирузян Л.А., Голденкова И.В., Корсунская И.М. и др. Научно обоснованные подходы к стандартизации ведения больных псориазом (обзор литературы). // *Проблемы стандартизации в здравоохранении.* 2006. № 6. С. 7–13.
29. Голденкова-Павлова И.В., Пирузян Э.С., Абдеев Р.М. и др. О необходимости популяционных исследований и учета этнической компоненты при изучении сложных генетически обусловленных патологий (на модели популяции Дагестана). // *Генетика.* 2006. Т. 42. № 8. С. 1137–1142.
30. Ахметова В.И., Галимова Э.С., Юсунбаев Б.Б., Хуснутдинова Э.К. Анализ генов предрасположенности к развитию псориаза в республиках Башкортостан и Хакасия. // *Медицинская генетика.* 2009. № 8. С. 29–35.
31. Bowcock A.M., Shanon W., Du F. et al. Insight into psoriasis and other inflammatory diseases from large scale gene expression studies. // *Hum. Mol. Genet.* 2001. V. 10. P. 1793–1805.
32. Oestreicher J.L., Walters I.B., Kikichi T. et al. Molecular classification of psoriasis disease-associated genes through pharmacogenomic expression profiling. // *Pharmacogenomics J.* 2001. V. 1. P. 272–287.
33. Nomura I., Gao B., Boguniewicz et al. Distinct pattern of gene expression in the skin lesions of atopic dermatitis and psoriasis: a gene microarray analysis. // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003. V. 112. P. 1195–1202.
34. Zhou X., Krueger J.G., Kao M.-C.J. et al. Novel mechanism of T-cell and dendritic cell activation revealed by profiling of psoriasis on the 63, 100-element oligonucleotide array. // *Physiol. Genomics.* 2003. V. 13. P. 69–78.
35. Пирузян Э.С., Никольская Т.А., Абдеев Р.М., Брускин С.А. Компоненты транскрипционного фактора AP-1 как гены-кандидаты, участвующие в развитии псориазического процесса. // *Молекулярная биология.* 2007. Т. 41. С. 1069–1080.
36. Sabat R., Philipp S., Höflich C., et al. Immunopathogenesis of psoriasis. // *Exp Dermatol.* 2007. V. 16. № 10. P. 779–98.
37. Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway C.A. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. // *Nature.* 1997. V. 388. P. 394–397.
38. McInturf J.E., Modlin R.L., Kim J. The role of toll-like receptors in the pathogenesis and treatment of dermatological disease. // *J. Invest Dermatol.* 2005. V. 125. № 1. P. 1–8.
39. Hu X., Chen J., Wang Lu et al. Crosstalk among Jak-STAT, Toll-like receptor, and ITAM dependent pathways in macrophage activation. // *Journal of Leukocyte Biology.* 2007. V. 82. P. 237–243.
40. Schnare M., Barton G.M., Holt A.C. et al. // *Nat Immunol.* 2001. V.2. № 10. P. 947–950.
41. Schjette K.W., Thompson K.M., Nilsen N. et al. Cutting edge: link between innate and adaptive immunity: Toll-like receptor 2 internalizes antigen for presentation to CD4+T cells and could be an efficient vaccine target. // *J. Immunol.* 2003. V. 171. № 1. P. 32–36.
42. Perez-Lorenzo R., Zambrano-Zaragoza J.F., Moo-Castillo K. et al. IgG class antibodies to heat shockinduced streptococcal antigens in psoriatic patients. // *Int J. Dermatol.* 2003. V. 42. P. 110–115.
43. Krueger J.G. The immunologic basis for the treatment of psoriasis with new biologic agents. // *J. Am. Acad. Dermatol.* 2002. V. 46. № 1. P. 1–23.
44. Reiss Y., Proudfoot A.E., Power C.A. et al. CCR10 Ligand Cutaneous T Cell-attracting Chemokine (CTACK) in Lymphocyte Trafficking to Inflamed Skin. // *J. Exp. Med.* V. 194. № 10. 2001.
45. Lonsdorf A.S., Hwang S.T., Enk A.H. et al. Chemokine Receptors in T-Cell-Mediated Diseases of the Skin // *J. Invest. Dermatol.* 2009.
46. Honey B., Alenius H., Muller A. et al. CCL27–CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation. // *Nat. Med.* 2002. V. 8. P. 157–65.
47. Chandrasekar B., Mummidi S., Valente A. et al. The Pro-atherogenic Cytokine Interleukin-18 Induces CXCL16 Expression in Rat Aortic Smooth Muscle Cells via MyD88, Interleukin-1 Receptor-associated Kinase, Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor 6, c-Src, Phosphatidylinositol 3-Kinase, Akt, c-Jun N-terminal Kinase, and Activator Protein-1 Signaling. // *The Journal of biological chemistry.* 2005. V. 280. № 28. P. 26263–26277.
48. Турпаев К.Т. Роль фактора транскрипции AP-1 в интеграции внутриклеточных систем. // *Молекулярная биология.* 2006. Т. 40. № 6. С. 945–961.
49. Gonsky R., Deem R.L., Hughes C.C. et al. Activation of the CD2 pathway in lamina propria T cells up-regulates functionally active AP-1 binding to the IL-2 promoter, resulting in messenger RNA transcription and IL-2 secretion. // *J. Immunol.* 1998. V. 160. № 10. P. 4914–22.
50. Bantel H., Schmitz M.L., Raible A. et al. Critical role of NF-kappaB and stress-activated protein kinases in steroid unresponsiveness. // *FASEB J.* 2002. V. 16. № 13. P. 1832–4.
51. Chandrasekar B., Mummidi S., Mahaimathan L. et al. Interleukin-18-induced human coronary artery smooth muscle cell migration is dependent on NF-kappaB and AP-1-mediated matrix metalloproteinase-9 expression and is inhibited by atorvastatin. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 22. P. 15099–109.
52. Брускин С.А. Кандидатская диссертация. 2008. С. 120.
53. Takeda A., Higuchi D., Takahashi T. et al. Overexpression of serpin squamous cell carcinoma antigens in psoriatic skin. // *J. Invest. Dermatol.* 2002. V. 118, № 1. P. 147–1454.
54. Брускин С.А., Абдеев Р.М., Мошковский С.А. и др. Протономные исследования псориаза как подход к идентификации потенциальных мишеней фармакотерапии. // *Клиническая дерматология и венерология.* 2009. № 1. С. 28–31.
55. Schreiber S., Rosenstiel P., Albrecht M. et al. Genetics of Chron disease, an archetypal inflammatory barrier disease. // *Nature.* 2005. V. 6. P. 376–388.
56. Sartor B.R. Mechanisms of Disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. // *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology.* 2006. V. 3. P. 390–407.
57. Пирузян Э.С., Ишкин А.А., Никольская Т.А. и др. Сравнительный анализ молекулярно-генетических процессов при патогенезе псориаза и болезни Крона. // *Молекулярная биология.* 2009. Т. 46. № 1. С. 175–179.
58. Chaudhari U., Romano P., Mulcahy L.D. et al. Efficacy safety of infliximab monotherapy for plaque-type psoriasis: a randomized trial. // *Lancet.* 2001. V. 357. P. 1842–1847.
59. Baeten D., Kruithof E., Van den Bosch et al. Sisitematic safety follow up in a cohort of 107 patients with spondyloarthropathy treated with infliximab: a new perspective on the role of host defence in the pathogenesis of the disease? // *Ann. Rheum. Dis.* 2003. V. 62. P. 829–834.
60. Sfrikakis P.P., Iliopoulos A., Elezoglou A. et al. Psoriasis induced by anti-tumor necrosis factor therapy: a paradoxical adverse reaction. // *Arthritis Rheum.* 2005. V. 52. P. 2513–2518.
61. Perarnique L., Puig L., Dalmau J. et al. Onset of flexural psoriasis during infliximab treatment for Crohn's disease. // *Clin. Exp. Dermatol.* 2005. V. 30. № 6. P. 713–714.
62. Umeno J., Matsumoto T., Jo Y. et al. Psoriasis during anti-tumor necrosis factor – alpha therapy for Crohn's disease. // *Inflamm. Bowel Dis.* 2007. V. 13. P. 18188–1189.

# 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

# Правила для авторов

## ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Журнал «Acta Naturae» публикует экспериментальные и обзорные статьи, а также проблемные статьи, мини-обзоры, краткие сообщения, посвященные наиболее актуальным вопросам фундаментальных и прикладных наук о живом и биотехнологий.

Журнал выпускается издательским домом «Парк-медиа» на русском и английском языках.

Редакция журнала «Acta Naturae» просит авторов руководствоваться приведенными ниже правилами. Статьи, оформленные без соблюдения этих правил, возвращаются авторам без рассмотрения.

Максимальный объем обзора вместе с таблицами и списком литературы 60 000 знаков (примерно 40 стр., формата А4, напечатанных через 1.5 интервала, шрифт Times New Roman, 12 размер) и 16 рисунков.

Объем экспериментальной статьи не должен превышать 30 000 знаков (20 стр. формата А4 вместе с таблицами и списком литературы). Число рисунков не должно превышать 10. Статьи большего объема принимаются только после предварительного согласования с редакцией.

Краткое сообщение должно содержать постановку задачи, экспериментальный материал и выводы. Объем краткого сообщения не должен превышать 12 000 знаков (8 стр. формата А4 вместе с таблицами и списком литературы не больше 12 источников). Число рисунков не должно превышать четыре.

Рукопись следует оформить набором файлов – текст, реферат, список цитируемой литературы, подписи к рисункам, таблицы – в формате Microsoft Word 2003 for Windows, рисунки в формате JPG или TIF, каждый рисунок оформляется отдельным файлом.

Рукопись направляется в редакцию в виде электронной версии. В качестве электронных носителей могут использоваться CD-ROM.

## ОФОРМЛЕНИЕ РУКОПИСЕЙ

Рукопись должна быть построена следующим образом:

УДК в левом верхнем углу, размер 9.

Название статьи. Заглавие не должно быть слишком длинным или коротким и малоинформативным. Оно должно отражать главный результат, суть и новизну работы.

Инициалы и фамилии авторов. Автор, ответственный за переписку с редакцией, включая работу с корректурой, выделяется сноской, внизу первой страницы рукописи приводится электронный адрес для переписки.

Полное название научной организации и ее ведомственная принадлежность.

Реферат. Структура реферата должна быть четкой и отражать следующее: постановка проблемы; описание экспериментальных методов, возможность практических приложений, возможность постановки новых задач. Средний объем реферата составляет 20 строк.

Ключевые слова. В них следует отразить: предмет исследования, метод, объект, специфику данной работы.

Список сокращений.

Заглавие статьи на английском языке.

Фамилии и инициалы авторов в английской транскрипции с пометками, указывающими на организацию, в которой работают авторы.

Полное название научной организации и ее ведомственная принадлежность на английском языке.

Введение.

Раздел «Экспериментальная часть».

Раздел «Результаты и обсуждения».

Раздел «Выводы». В конце раздела указываются названия организаций, финансировавших работу, в скобках – номера грантов.

Раздел «Список литературы». Ссылки в тексте на цитируемую литературу даются в квадратных скобках, например [1].

Реферат на английском языке, являющийся переводом аннотации (резюме) на русском языке.

## РЕКОМЕНДАЦИИ ПО НАБОРУ И ОФОРМЛЕНИЮ ТЕКСТА

Рекомендуется использование редактора Microsoft Word 2003 for Windows.

Шрифт – Times New Roman. Стандартный размер шрифта – 12.

Интервал между строками 1.5.

Нецелесообразно использовать более одного пробела между словами.

Запрещено использовать при наборе текста автоматическое создание сносок, автоматический перенос или автоматический запрет переносов, создание списков, автоматический отступ и т.п.

При создании таблицы рекомендуется использовать возможности Word (Таблица – Добавить таблицу) или MS Excel. Таблицы, набранные вручную (с помощью большого числа пробелов, не используя ячейки) не могут быть использованы.

Между инициалами и фамилией всегда ставится пробел: А.А. Иванов (кроме перечисления авторов в заглавии статьи, где пробелы ставятся и между инициалами – А. А. Иванов).

Во всем тексте, кроме даты поступления, все даты в виде «число.месяц.год», набираются следующим образом: 02.05.1991, 26.12.1874 и т.п.

Точка не ставится после: «УДК», заглавия статьи, авторов, адресов, заголовков и подзаголовков, названий таблиц, подписей к рисункам, размерностей (с – секунда, г – грамм, мин – минута, ч – час, сут – сутки, град – градус).

Точка ставится после: сноска (в том числе в таблицах), примечаний к таблице, краткой аннотации, сокращений (мес. – месяц, г. – год, т. пл. – температура плавления) (но не ставится в подстрочных индексах:  $T_m$  – температура плавления,  $T_{ф.п.}$  – температура фазового перехода). Исключение: млн – миллион – без точки.

Десятичные цифры набираются только через точку, а не через запятую (0.25 вместо 0,25).

Сокращения единиц измерений пишутся только русскими буквами (мкМ, но не  $\mu\text{M}$ ; нм, но не nm).

Знак « $\rightarrow$ » (тире) отбрасывается пробелами, знаки «минус», «интервал», или «химическая связь» пробелами не отбрасываются.

В качестве знака умножения используется только « $\times$ ». Знак « $\times$ » ставится только в том случае, если справа от него стоит число. Символом « $\ast$ » обозначаются комплексные соединения в химических формулах, а также нековалентные комплексы (ДНК-РНК и т.п.). Используются только «кавычки», но не "кавычки". Числовой материал представляется в виде таблиц.

В формулах используются буквы латинского и греческого алфавитов.

Латинские названия родов и видов живого мира пишутся курсивом, таксонов более высокого ранга – прямым шрифтом. Названия вирусов и бактериофагов в латинской транскрипции пишутся прямым текстом. Названия генов (кроме обозначения генов дрожжей) пишутся строчным курсивом, названия белков – прямым шрифтом.

Название нуклеотидов (A, T, G, C, U), аминокислотных остатков (Arg, Ile, Val и т.д.) и фосфатов (АТР, АМР и т.д.) пишутся в латинской транскрипции прямым шрифтом.

Нумерация азотистых оснований и аминокислотных остатков пишется без дефиса (Т34, Ala89).

При выборе единиц измерения необходимо придерживаться международной системы единиц СИ.

Молекулярная масса выражается в дальтонах (Да, кДа, МДа).

Количество пар нуклеотидов обозначается сокращениями (п.н., т.п.н.).

Количество аминокислотных остатков обозначается сокращением (а.о.).

Биохимические термины (в частности, названия ферментов) приводятся в соответствии с международными правилами IUPAC.

Сокращения терминов и названий в тексте должны быть сведены к минимуму.

Повторение одних и тех же данных в тексте, таблицах и графиках недопустимо.

## ТРЕБОВАНИЯ К ИЛЛУСТРАЦИЯМ

Рисунки к статьям приводятся отдельными файлами.

Иллюстрации должны иметь разрешение не ниже 300 dpi для цветных и полутоновых изображений и не менее 600 dpi для черно-белых иллюстраций

Недопустимо сохранение в файлах неиспользуемых путей отбравок и дополнительных каналов (Path и Alpha Channel), также недопустимо использование дополнительных слов.

Форматы файлов – Adobe Photoshop до 7.0. включительно TIFF, JPG.

## РЕЦЕНЗИРОВАНИЕ, ПОДГОТОВКА РУКОПИСИ К ПЕЧАТИ, ОЧЕРЕДНОСТЬ ПУБЛИКАЦИИ

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

Статьи, поступившие в редакцию, проходят экспертизу членов редколлегии и при необходимости направляются на внешнее рецензирование. Выбор рецензента является прерогативой редакции. Рукопись направляется на отзыв специалистам в данной области исследований, и по результатам рецензирования редколлегия определяет дальнейшую судьбу рукописи: принятие к публикации в представленном виде, необходимость доработки или отклонение.

Решением редакционной коллегии статья может быть отклонена, если она не удовлетворяет перечисленным выше требованиям.

Рукопись, направленная авторам на доработку по замечаниям рецензентов и редакторов, рецензируется повторно, после чего редколлегия вновь решает вопрос о приемлемости ее для публикации. В начале публикуемой статьи приводятся даты поступления рукописи в редакцию и принятия рукописи в печать.

Возвращение рукописи авторам на доработку не означает, что статья принята к печати. После получения доработанного текста рукопись вновь рассматривается редколлегией. Доработанный текст автор должен вернуть вместе с первоначальным экземпляром статьи, а также ответами на все замечания. Датой поступления считается день получения редакцией окончательного варианта статьи.

Переработанная рукопись должна быть возвращена в редакцию в течение одной недели после получения авторами отзывов; в противном случае рукопись рассматривается как вновь поступившая.

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

После сдачи очередного выпуска журнала на макетирование редакция рассылает авторам по электронной почте корректуры статей в виде PDF файла.

На стадии корректуры не допускаются замены текста, рисунков или таблиц. Если это все же необходимо, то данный вопрос решается редколлекцией.

## ОФОРМЛЕНИЕ ССЫЛОК

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

Для периодических изданий: фамилия и инициалы автора, название журнала, год издания, том, номер, первая и последняя страницы статьи. Bressanelli S., Tomei L., Rousset A., et al // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. P. 13034–13039 (если авторов больше пяти). Если авторов меньше пяти, указываются все авторы.

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

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

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

Список литературы печатается на отдельной странице.

Таблицы печатаются на отдельной странице.

Подписи к рисункам печатаются на отдельной странице.

Для связи с редакцией следует использовать следующие электронные адреса: rpeetrov@strf.ru, vera.norre@gmail.com, vsychev@strf.ru, тел.: (495) 727-38-60, (495) 930-80-05